

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CYNTHIA HERNANDES COSTA

**VARIAÇÕES ALÉLICAS E COMBINAÇÕES *KIR2DL4* E *HLA-G* EM CASAIS
SUBMETIDOS A TRATAMENTO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

CURITIBA

2015

CYNTHIA HERNANDES COSTA

**VARIAÇÕES ALÉLICAS E COMBINAÇÕES *KIR2DL4* E *HLA-G* EM CASAIS
SUBMETIDOS A TRATAMENTO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutora em
Genética, do Curso de Pós-Graduação em
Genética do Departamento de Genética, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria da Graça
Bicalho

CURITIBA

2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa de tese de doutorado, a qual se submeteu **CYNTHIA HERNANDES COSTA**, para obtenção do título de doutora em genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se aprove a candidata. Secretária da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 29 de outubro de 2015

Doutora Fabiana Poerner
Instituto de Biologia Molecular do Paraná – Membro Titular

Doutor Newton Sergio Carvalho
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutora Eni Alcântara Picchioni
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutora Danielle Malheiros Ferreira
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutora Maria da Graça Bicalho
Universidade Federal do Paraná – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Professora Doutora Lupe Furtado Alle
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

RESUMO

Os genes *HLA* codificam produtos proteicos que participam do reconhecimento de moléculas próprias e não próprias. Este sistema gênico codifica proteínas com propriedades imunológicas similares, mas estruturalmente diferentes, e classificadas em proteínas HLA de classe I, II e III. O gene *HLA-G* codifica uma proteína classe I não-clássica (Ib) que se encontra expressa principalmente nas células do trofoblasto e tem suma importância na imunotolerância da interface materno-fetal, tendo como importante receptor KIR2DL4 expresso nas células uNK. *KIR2DL4* pertence ao grupo de genes *KIR*, e apresenta motivos e funções de inibição e ativação. Neste contexto, acredita-se que casais bem sucedidos na implantação do embrião e casais mal sucedidos nas técnicas de reprodução assistida (TRA) apresentariam variantes alélicas e genótípicas do gene *KIR2DL4* e nos *SNPs* da região 3' URR de *HLA-G* associadas ao sucesso ou insucesso implantacionais. Portanto, o presente estudo investigou a influência de variantes alélicas de *KIR2DL4* e combinações genótípicas KIR-HLA-G no sucesso da implantação do embrião em casais com necessidade do TRA e em respectivo grupo controle. O estudo foi subdividido em duas partes: na primeira parte, para investigar a diversidade do gene *HLA-G*, foram considerados 33 casais submetidos ao TRA (n=66) e 120 casais que conceberam naturalmente (grupo controle, n=240). Já na segunda parte, para avaliar a diversidade do gene *KIR2DL4* e a combinação genotípica com HLA-G, amostras de 42 casais submetidos ao TRA (n=84), de 120 casais com concepção natural - controles (n=240) e de 35 mulheres grávidas (n=35) foram genotipadas. A genotipagem foi realizada com o auxílio da técnica de PCR; os alelos, genótipos e haplótipos foram comparados entre os grupos por meio do Teste Exato de Fisher realizado no programa GENEPOP; os *Odds ratio* (OR) foram calculados no BIOSTAT 5.0 com um intervalo de confiança de 95%; e as estimativas das frequências haplotípicas foram calculadas no ARLEQUIN. Observou-se que mesmo com a estratificação dos grupos por gênero e/ou sucesso/insucesso no TRA, apenas o haplótipo HLA-G*01:01:01b/HLA-G*01:01:01 diferiu significativamente após correção de Bonferroni: a frequência deste haplótipo estava mais elevada no grupo controle que no grupo de casais submetidos ao TRA. O alelo KIR2DL4*00102 foi significativamente mais frequente em casais controle e em casais com sucesso no TRA; o alelo KIR2DL4*011 foi observado com maior frequência em casais caso; e o genótipo KIR2DL4*00102 /KIR2DL4*00801 foi mais frequente no grupo controle. Na comparação de haplótipos, o haplótipo 3 (HLA - G*01:01:01a/HLA - G*01:01:01/KIR2DL4*00102) esteve significativamente mais frequente em casais controles, já o haplótipo 4 (HLA-G*01:01:02a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00102) apresentou maior frequência em homens controle, enquanto o haplótipo 5 (HLA-G*01:01:02a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00501) foi mais frequente em mulheres com sucesso no TRA. Entre os genótipos do casal, o genótipo materno HLA-G*01:01/HLA-G*01:03 e o paterno HLA-G*01:01/HLA-G*01:01 apresentaram, significativamente, maior frequência nos casais controle. No genótipo F1 observou-se maior frequência de HLA-G*01:01/HLA-G*01:01 em filhos de casais controle, já o genótipo HLA-G*01:01/HLA-G*01:05N em filhos de casais caso. Este conjunto de resultados sugere a influência da variabilidade dos genes *KIR2DL4* e *HLA-G* na fertilidade do casal e também no sucesso implantacional observado após TRA.

Palavras-chave: Interface materno-fetal, proteína HLA-G, receptor KIR2DL4, reprodução humana, susceptibilidade haplotípica

ABSTRACT

HLA genes encode protein products that take part in the recognition of proper and non-proper molecules. This gene system encodes proteins with similar immunological properties, but structurally different, and classified in *HLA* proteins of class I, II and III. *HLA-G* gene encodes a non-classical class I protein (Ib) mainly expressed in trophoblastic cells, and which present a great importance in immune tolerance of the fetus-maternal interface, having as an important receptor *KIR2DL4* expressed in the uNK cells. *KIR2DL4* belongs to a group of *KIR* genes, and has inhibition and activation motifs and functions. In this context, we believe that successful couples in embryo implantation and unsuccessful couples in assisted reproduction techniques (ART) would show allele and genotype variants of *KIR2DL4* gene and *SNPs* in the 3'URR region of *HLA-G* associated with the successful or unsuccessful implantation. Thus, the present study investigated the influence of allele variants in *KIR2DL4* and *KIR-HLA-G* genotype combinations in the success of embryo implantation in couples who needed ART and in the respective control group. The study was subdivided in two parts: in the first one, to investigate the diversity of *HLA-G* gene, we considered 33 couples submitted to ART (n=66) and 120 couples who conceived naturally (control group, n=240). In the second part, to evaluate the diversity of *KIR2DL4* gene and the genotype combination with *HLA-G*, samples of 42 couples submitted to ART (n=84), of 120 couples who conceived naturally - controls (n=240) and 35 pregnant women (n=35) were genotyped. Genotyping was performed with the aid of PCR technique; alleles, genotypes and haplotypes were compared between groups by the Fisher Exact Test performed in the program GENEPOP; Odds ratio (OR) were calculated in BIOESTAT 5.0 with a confidence interval of 95%; and the estimates of haplotype frequencies were calculated in ARLEQUIN. We observed that even after group stratification by gender and/or successful/unsuccessful ART, only the *HLA-G*01:01:01*/*HLA-G*01:01:01* haplotype significantly differed after Bonferroni correction: the frequency of this haplotype was higher in the control group than in the group of couples submitted to ART. The allele *KIR2DL4*00102* was significantly more frequent in control couples and in successful couples in ART; the allele *KIR2DL4*0011* was more frequent in case couples; and the genotype *KIR2DL4*00102/KIR2DL4*00801* was more frequent in the control group. In haplotypes comparison, the haplotype #3 (*HLA - G*01:01:01a/HLA - G*01:01:01/KIR2DL4*00102*) was significantly more frequent in control couples, the haplotype #4 (*HLA-G*01:01:02a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00102*) presented a higher frequency in control men, while the haplotype #5 (*HLA-G*01:01:02a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00501*) was more frequent in successful women in ART. Among the couples' genotypes, the maternal genotype *HLA-G*01:01/HLA-G*01:03* and the paternal genotype *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01* presented, significantly, higher frequency in control couples. In F1 genotype, we observed higher frequency of *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01* in children of the control couples, and the genotype *HLA-G*01:01/HLA-G*01:05N* in children of the case group couples. This set of results suggests the influence in the variability of *KIR2DL4* and *HLA-G* genes in the couple fertility as well as in implantation success observed after ART.

Keywords: Fetus-maternal interface, HLA-G protein, KIR2DL4 receptor, human reproduction, haplotype susceptibility

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a Maria da Graça Bicalho, pelo apoio, tempo disponível, pela compreensão das dificuldades da distância e dedicação para a realização deste projeto como profissional e amiga.

À equipe do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade.

Ao Dr. Alessandro Schuffer pela ajuda na seleção e abordagem dos casais pacientes, apoio e incentivo para a realização do trabalho.

À amiga Geórgia F. Gelmini por tudo que passamos, pelo apoio, incentivo, por acreditar em mim desde o mestrado e pela incansável parceria durante estes anos juntas na pós-graduação, sem você teria sido muito mais difícil.

Às amigas Juliana Cochenski e Juliana Marta pelas longas conversas pelo celular sempre incentivando e escutando todos os lamentos, não apenas os do doutorado, mas sempre com ombros amigos, conselhos carinhosos e puxões de orelha quando se fez necessário.

Às minhas amigas Carline L. Carazzo e Mariana Guimarães, que sempre acreditaram, incentivaram e apoiaram mesmo quando eu precisava ficar ausente.

Ao melhor namorado, noivo e marido que existe, Rafael Veron Schencknecht, sempre disposto a ajudar, apoiar, incentivar, tomando conta de tudo enquanto eu só tinha olhos para a tese, que me suportou apesar de todo mau humor, nervosismo, ansiedade.

À minha família pelo incentivo, apoio e confiança desde a seleção do mestrado até o final do doutorado, compreendendo os momentos de ausência e suportando os momentos difíceis em que a saudade apertava.

A Deus por me dar forças para seguir o caminho nas fraquezas através das pessoas que colocou ao meu redor.

Cada um a sua maneira foi determinante para que eu seguisse na caminhada e hoje possa com orgulho dizer que consegui chegar ao final de mais uma importante etapa da minha vida profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. HIPÓTESE	11
1.2. OBJETIVOS.....	12
1.2.1. Objetivo Geral	12
1.2.2. Objetivos Específicos	12
1.3. JUSTIFICATIVA	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. REPRODUÇÃO HUMANA	13
2.1.1. Infertilidade	13
2.1.1.1. Técnicas de reprodução assistida (TRA)	14
2.1.1.1.1. <i>Fertilização in vitro</i> (FIV).....	15
2.1.1.1.2. Inseminação artificial (IA).....	16
2.1.1.2. Causas de infertilidade com indicação de TRA.....	17
2.2. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE	18
2.3. HISTÓRICO DO HLA-G.....	20
2.4. ESTRUTURA DO GENE	20
2.5. PROTEÍNA HLA-G, ISOFORMAS E FUNÇÃO	21
2.6. REGULAÇÃO DO GENE HLA-G.....	23
2.7. POLIMORFISMOS DO GENE HLA-G.....	26
2.7.1. Polimorfismos da região codificadora.....	26
2.7.2. Polimorfismos da região reguladora.....	29
2.7.2.1. Variações na região 5'URR.....	29
2.7.2.2. Variações na região 3'UTR	30
2.8. INFLUÊNCIA DO HLA-G NA REPRODUÇÃO	30
2.9. CÉLULAS NATURAL KILLER.....	34
2.10. GENES KIR	37
2.11. GENE KIR2DL4	40
2.12. POLIMORFISMOS DO GENE KIR2DL4	41
2.13. DIVERSIDADE POPULACIONAL DE KIR2DL4	44

2.14. GENE KIR2DL4 E REPRODUÇÃO.....	45
3. RESULTADOS	46
CAPÍTULO I.....	47
<i>HLA-G</i> profile of infertile couples who underwent assisted reproduction treatment.....	48
1. Introduction	49
2. Materials and methods.....	51
2.1. Subjects.....	51
2.2. HLA-G Genotyping.....	52
2.3. Statistical Analysis	53
3. Results	54
3.1.Characterization of ART patients	54
3.2. HLA-G 5'URR: alleles and genotypes diversity.....	55
3.3. HLA-G allelic and genotype diversity	56
3.4. Haplotypes: infertility and ART outcomes.....	57
4. Discussion.....	57
5. Conclusion.....	61
Acknowledgements	61
References	61
CAPÍTULO II.....	74
Variabilidade de KIR2DL4 e HLA-G influenciam no sucesso implantacional	74
INTRODUÇÃO.....	75
MATERIAL E MÉTODOS.....	77
Amostra	77
Genotipagem KIR2DL4	78
Genotipagem HLA-G	79
Análise estatística	80
RESULTADOS	81
DISCUSSÃO.....	94
CONCLUSÃO.....	97
AGRADECIMENTOS	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
4. DISCUSSÃO	103
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
APÊNDICE	133
APÊNDICE I.....	134
MATERIAL E MÉTODOS.....	135
DELINEAMENTO.....	135
AMOSTRA.....	136
PROCESSAMENTO DA AMOSTRA	137
Extração.....	137
Genotipagem.....	137
Análise estatística	140
ANEXO.....	141
ANEXO I.....	142
ANEXO II	144

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diferenças entre as TRA.	14
Figura 2: Localização do sistema HLA no cromossomo 6 (6p21.3).	18
Figura 3: Estrutura e composição das isoformas do HLA-G.....	22
Figura 4: Polimorfismos da região 5'URR do gene <i>HLA-G</i> e os sítios de ligação dos fatores transcripcionais reguladores da expressão do gene..	29
Figura 5: Controle da atividade das células NK resulta do balanço dos receptores inibidores e ativadores.....	35
Figura 6: Organização genômica dos genes receptores das células NK, em humanos e ratos..	36
Figura 7: Representação da estrutura da proteína KIR em cada gene.	38
Figura 8 Nomenclatura dos alelos KIR, adotado pelo HUGO (<i>Human Genome Organization</i>).	39
Figura 9: Representação dos dois grupos de haplótipos dos genes <i>KIR</i>	40

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Associação de alelos <i>HLA-G</i> com as formas sHLA-G e níveis solúveis de HLA de Classe I.	23
Tabela II: Polimorfismos da região codificadora de <i>HLA-G</i> (exon 2, 3, 4 e 5).	27
Tabela III: Revisão dos estudos que investigam <i>HLA-G</i> e sua influência em diferentes etapas do processo reprodutivo.	31
Tabela IV: Alelos <i>KIR2DL4</i>	42
Tabela V: Estudos que investigaram <i>KIR2DL4</i> e sua associação com patologias.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	Região 3' não traduzida
5'URR	Região 5' reguladora não traduzida
β_2m	Beta-2 microglobulina
A	Adenina
AER	Abortamento espontâneo recorrente
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (Células apresentadoras de antígenos)
ART	<i>Assisted reproduction technologies</i>
ATF	<i>Activating transcription factor</i> (Ativador de fator de transcrição)
C	Citosina
AMPc	Adenina mono fosfato cíclica
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CIITA	Transativador de classe II
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i> (Proteína ligante ao elemento de resposta ao cAMP)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
<i>EnhA</i>	Intensificador A
<i>EnhB</i>	Intensificador B
EVT	<i>Extravillous trophoblast</i> (trofoblasto extra-villus)
EXO I	Exonuclease I
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
G	Guanina
HC-UFPR	Hospital de Clínicas– Universidade Federal do Paraná
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
HSE	<i>Heat shock element</i> (Elemento de choque térmico)
HSF1	<i>Heat shock factor 1</i> (Fator 1 de choque térmico)

IA	Inseminação artificial
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ILT	<i>Immunoglobulin-like transcript</i> (Transcrito como imunoglobulina)
IMGT	<i>Immunogenetics</i> (Imunogenética)
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i> (Fator regulatório de interferon)
ISRE	<i>Interferon specific regulation element</i> (Elemento de resposta de interferon)
ITAM	<i>Immunoreceptors tyrosine-based ativatory motifs</i> (imunoreceptores de motivos ativadores)
ITIM	<i>Immunoreceptors tyrosine-based inhibitory motifs</i> (imunoreceptores de motivos inibidores)
KIR	<i>Killer cell immunoglobulin like receptor</i> (Receptores semelhantes a imunoglobulina das células <i>natural killer</i>)
LCR	<i>Locus control region</i> (Região controladora de locus)
LIGH	Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade
LIR	<i>Leukocyte immunoglobulin-like receptors</i> (Receptores inibidores leucocitários semelhantes às imunoglobulinas)
LTA	Linfotoxina α
LTB	Linfotoxina β
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator transcricional κ B
NK	<i>Natural killer</i> (Exterminadoras naturais)
NS	Não significativo
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
RA	Reprodução assistida
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (Fosfatase alcalina de camarão)
sHLA-G	HLA-G solúvel
sICAM	<i>Soluble intercellular adhesion molecule</i> (Molécula solúvel de adesão intracelular)

SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Alteração de uma única base)
T	Timina
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
TRA	Técnicas de reprodução assistida
U	Uracila
uNK	<i>Uterine Natural Killer</i> (Exterminadoras naturais uterinas)
ZFX	<i>Zinger finger X</i> (Dedo de zinco X)

1. INTRODUÇÃO

Técnicas de reprodução assistida (TRA) têm sido utilizadas como alternativas para casais que desejam ter filhos (GOLDBERG *et al.*, 2007) e não conseguem uma fertilização natural. Alguns procedimentos no âmbito da reprodução assistida, tais como a técnica da “ruptura da zona pelúcida” juntamente com testes diagnósticos genéticos pré-implantacionais mais acurados e estudos genéticos, têm auxiliado um grande número de casais a consolidar gestações *in vitro* e *in vivo* (PAULI *et al.*, 2009).

O sistema gênico *HLA* é composto por vários genes HLA, clássicos e não clássicos de Classe I e de Classe II. Dentre os genes HLA de Classe I não clássicos, o gene *HLA-G* tem sido referido como importante modulador da tolerância materno-fetal (KOVATS *et al.*, 1990; VAN DER VEN *et al.*, 2000; ISHITANI *et al.*, 2003). Este codifica uma proteína solúvel com capacidade de atravessar a barreira placentária e, que também é expressa nas células do trofoblasto.

O processo implantacional, entre outros fatores, resulta de interações entre receptores KIR maternos expressos pelas células Natural Killer uterinas (uNK) e ligantes *HLA-G* expressos pelas células do trofoblasto extra-villus (EVT). Células do trofoblasto expressam *HLA-G*, que interage com receptores específicos presentes na membrana ou no interior das células uNK e modulam os níveis de citocinas na interface materno fetal, contribuindo para a remodelação adequada da artéria uterina e permitindo ao embrião acesso ao suprimento sanguíneo materno. Isso ocorre quando o EVT invade a artéria uterina convertendo-a num vaso sanguíneo de alta condutibilidade e garantindo sua nutrição durante o processo gestacional (NAVARRO *et al.*, 1999; VAN DER VEN *et al.*, 2000; FANCHIN *et al.* 2007).

Variações genéticas que impactam na diversidade e/ou intensidade das interações KIR-ligante poderiam influenciar no processo implantacional. Variantes alélicas de *HLA-G* (exon 2, exon 3 e exon 4) têm sido associadas à expressão aumentada ou diminuída da proteína *HLA-G*. O processamento alternativo do mRNA de *HLA-G* determinaria a expressão das isoformas solúvel (sHLA-G) ou ligada à membrana (mHLA-G). Além do polimorfismo ins/del de 14pb presente no exon 8, dos SNPs da região promotora 5'URR, SNPs localizados na região 3' não traduzida (3'UTR) poderiam também alterar a estabilidade do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), e a expressão de *HLA-G* pela via de regulação por meio de microRNAs, que bloqueariam a expressão gênica no nível pós-transcricional. Outro fator que influencia no processo implantacional do embrião é a

expressão do receptor KIR2DL4 pela células uNK, em sua forma ligada à membrana ou endocítica, conforme a variante alélica codificante.

Dessa forma, é possível que variações nucleotídicas em regiões reguladoras e codificadoras de *HLA-G* que alterem sua expressão, somados a variantes alélicas de KIR2DL4 que alterem a afinidade do receptor com seu ligante específico, resultem em diferenças nos níveis de citocinas produzidas na interface materno-fetal e consequentemente no processo de aceitação fetal pelo organismo materno.

1.1. HIPÓTESE

Variações alélicas em *KIR2DL4* presentes na mãe e *HLA-G* expressos pelo embrião e na interface materna, resultariam respectivamente em combinações genéticas KIR2DL4-ligante com diferentes afinidades e intensidades de interação, influenciando a produção de citocinas pelas células uNK. Por outro lado, isoformas e níveis insuficientes da proteína HLA-G, decorrentes de variações alélicas e interações não funcionais ou de baixa especificidade com fatores transcricionais e sítios reguladores 5'UTR e, em particular da região 3'UTR e microRNAs, atuariam sinergisticamente para estabelecer a invasão inadequada do trofoblasto para remodelagem da artéria uterina e consequente insucesso gestacional.

Os variantes alélicos e genótipos do gene KIR2DL4 e os SNPs das regiões 5'UTR e 3'UTR de *HLA-G* apresentariam distribuição distinta nas amostras de casais em Tratamento de Reprodução Assistida (TRA) quando comparados com casais com sucesso reprodutivo sem auxílio de tratamento.

Da mesma forma, os variantes alélicos e genótipos do gene KIR2DL4 e os SNPs da região 3'UTR de *HLA-G* apresentariam diferenças entre casais que obtém sucesso na implantação do embrião e casais que não obtém sucesso no tratamento.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

Investigar a possível influência de variantes alélicas de *KIR2DL4* e combinações genotípicas *KIR*-*HLA-G*, no sucesso da implantação de embrião em casais com necessidade de TRA e controles.

1.2.2. Objetivos Específicos

1. Investigar a variação alélica dos genes *KIR2DL4* e *HLA-G*, região promotora e codificadora, em casais em TRA e casais controle.
2. Determinar e comparar as frequências alélicas e genotípicas dos genes *KIR2DL4* e *HLA-G*, região promotora e codificadora, em casais TRA e casais controle.
3. Estabelecer as combinações *KIR*-ligante e seu impacto no sucesso implantacional em casais TRA e casais controle.
4. Relacionar variações alélicas dos genes *KIR2DL4* e *HLA-G*, região promotora e codificadora, em casais com sucesso no TRA e em casais com insucesso no TRA.

1.3. JUSTIFICATIVA

Este estudo é pioneiro na região sul do Brasil, investigando associação entre SNPs situados em regiões reguladoras e codificadora de *HLA-G* e alelos do gene *KIR2DL4* em casais submetidos à TRA e casais controles. Com nossos resultados pretendemos contribuir para uma maior compreensão do impacto das combinações genéticas materno-fetais (interações *KIR2DL4* e *HLA-G*) nos eventos iniciais da implantação do trofoblasto no endométrio materno.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. REPRODUÇÃO HUMANA

A reprodução humana retrata um quadro intrigante, em que a mãe hospeda o feto durante 9 meses, sem que haja reconhecimento do não-próprio da forma que ocorre com os organismos invasores e a reação de rejeição natural, que ocasionaria o aborto. Esta incógnita sobre a sobrevivência do feto no interior do organismo materno sem ativação do sistema imunológico da mãe em uma via clássica de inflamação, levou Medawar, em 1953, a sugerir mecanismos para a tolerância imunológica materna:

- Separação anatômica entre o feto e a mãe;
- Imaturidade antigênica do feto;
- Modulação de resposta imunológica materna.

Acredita-se, atualmente, que a combinação entre esses mecanismos é essencial para o correto desenvolvimento fetal durante o período gestacional. A aceitação materna do feto, considerado um semienxerto, já que possui antígenos maternos e paternos, é o resultado do isolamento do embrião em um ambiente semipermeável, o que modula a resposta imunitária da mãe e possibilita o desenvolvimento bem sucedido da gravidez (revisado por SARAFANA *et al.*, 2007).

2.1.1. Infertilidade

A taxa de infertilidade humana tem aumentado nas últimas décadas, e, em paralelo a este aumento, a medicina reprodutiva iniciou o desenvolvimento de TRA (revisado por VELA *et al.*, 2009), objetivando, na época da implantação das técnicas, possibilitar a gestação em mulheres com obstruções tubárias (STEPTOE e EDWARDS, 1978). Atualmente, as TRA são indicadas para os casais que apresentam qualquer causa de

infertilidade, decorrente de fatores femininos ou masculinos (revisado por VELA *et al.*, 2009).

2.1.1.1. Técnicas de reprodução assistida (TRA)

O marco na área da medicina reprodutiva, que foca o desenvolvimento destas técnicas, ocorreu em 1978, com o nascimento da primeira criança pela técnica de FIV (STEPTOE e EDWARDS, 1978). Nas décadas seguintes, outras técnicas foram introduzidas, incluindo transferência intrafalopiana do zigoto e transferência intrafalopiana de gameta, porém, por serem mais invasivas, houve uma preferência pela FIV, que apresenta altas taxas de sucesso e uma menor invasão (LEVRAN *et al.*, 2002; ASLAN *et al.*, 2005), sendo ao lado da inseminação artificial (IA) a técnica mais utilizada, atualmente, em centros de reprodução assistida. Na Figura 1 pode-se ver a comparação entre os diferentes tipos de TRA.



Figura 1: Diferenças entre as TRA.

2.1.1.1.1. *Fertilização in vitro* (FIV)

A FIV é indicada para o tratamento em casais nos quais a infertilidade é de origem feminina e/ou masculina, sendo responsável por aproximadamente 1 nascimento em 50 na Suécia, 1 em 60 na Austrália e 1 em 100 nos Estados Unidos (revisado por PAULI *et al.*, 2009; VELA *et al.*, 2009). No Brasil não estão disponíveis dados epidemiológicos quanto à taxa de nascimentos decorrentes de FIV. Esta técnica consiste dos seguintes passos:

- Estimulação de múltiplos folículos – para a produção de um coorte (do latim *Cohors* ou subdivisões) de folículos uniformes, com desenvolvimento e maturação controlados permitindo a maturação de múltiplos óocitos (PAULI *et al.*, 2009).

- Captura dos óocitos – ocorria por laparoscopia, procedimento cirúrgico invasivo, sob o efeito de anestésico, porém com o avanço do ultra-som, o folículo pode ser identificado e a retirada do óocito ocorre através da aspiração a vácuo, procedimento menos invasivo (LEVENS *et al.*, 2009).

- Captura dos espermatozóides – sem auxílio de estimulação da produção prévia esta captura ocorre por masturbação na maioria dos tratamentos. Porém em casos de azoospermia, realiza-se a captura dos espermatozóides por aspiração (punção) epididimal ou extração (procedimento cirúrgico) testicular (revisado por PAULI *et al.*, 2009; VELA *et al.*, 2009).

- Fecundação do óocito – a fertilização pode ocorrer pela incubação do óocito com milhares de espermatozóides, onde o gameta masculino mais apto penetra na zona pelúcida do óocito; ou pela inserção de espermatozóides no citoplasma do óocito, por meio de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). Em casos de infertilidade masculina mais severa, o gameta masculino, pré-selecionado, penetra a zona pelúcida com auxílio da injeção (VEECK, 1999).

- Seleção e transferência do embrião – a definição do embrião a ser selecionado ocorre pela análise morfológica (taxa de clivagem, simetria do blastômero, aparência citoplasmática, extensão da fragmentação e estado nuclear do blastômero) (RIENZI *et al.*, 2005), pelo diagnóstico pré-implantacional, que avalia a presença de alterações citogenéticas, principalmente aneuploidias e rearranjos cromossômicos (KULIEV *et al.*, 2008), e mais recentemente, pela quantificação da proteína de sHLA-G. Estudos recentes sobre a presença da proteína HLA-G no sobrenadante da cultura, têm sido sugestivos do seu potencial papel como biomarcador no prognóstico implantacional (BORGATTI *et al.*, 2008;

WARNER *et al.*, 2008). O número de embriões a serem implantados é determinado, principalmente, pela idade materna (MILKI *et al.*, 2003). A transferência para o útero materno, entre o terceiro e o quinto dia após a fecundação, realiza-se via cateter transcervical flexível ou para as trompas de Falópio por laparoscopia. A implantação na parede uterina ocorre aproximadamente no sexto dia, na fase de blastocisto (cerca de 64 células), para a placentação do trofoblasto e desenvolvimento natural do embrião durante a gestação no útero materno (BLAKE *et al.*, 2007).

2.1.1.1.2. Inseminação artificial (IA)

A IA é indicada em casos que a infertilidade do casal é devido a um fator masculino, fator desconhecido ou ainda em casos de endometriose em nível mínimo ou moderado. A técnica pode ser com ou sem o auxílio da estimulação ovariana (BENS DORP *et al.*, 2007). As etapas deste procedimento são:

- Preparação do sêmen – o plasma seminal é removido por centrifugação dos espermatozoides através de meio de cultura ou por gradiente de densidade seguido de re-suspensão em meio de cultura adequado. A finalidade desta remoção é evitar as contrações uterinas induzidas por prostaglandinas (BOOMSMA *et al.*, 2007).

- Inseminação – pode ocorrer em diferentes etapas e diversas vezes durante o mesmo período de ovulação. No entanto é comumente realizada entre 32 a 36 horas após a estimulação da ovulação, pois apesar do momento da inseminação durante a ovulação ser fundamental para uma maior taxa de sucesso, não há a caracterização de um momento ideal (RAGNI *et al.*, 2004). O depósito da suspensão dos espermatozoides por um cateter pequeno e flexível, em geral sem auxílio de imagem, pode ser no colo do útero, na trompa de Falópio, através do peritônio, sendo utilizado um maior volume do inseminado quando o procedimento ocorre na trompa, pois se acredita que uma parte do volume pode permanecer na cavidade peritoniana (KAHN *et al.*, 1992).

2.1.1.2. Causas de infertilidade com indicação de TRA

Endometriose – alterações no endométrio ou presença de tecido endometrial fora de sua localização habitual, fora do útero. Acomete cerca de 25 a 50% das mulheres inférteis e 5% das mulheres férteis (VERKAUF, 1987). O uso da FIV como tratamento para essa causa de infertilidade é recomendado para pacientes que apresentam doenças tubárias ou não responderam ao tratamento cirúrgico de remoção do tecido do endométrio, ou quando da infertilidade masculina (KENNEDY *et al.*, 2005). A infertilidade resultante da endometriose pode ocorrer pela distorção das tubas uterinas, dificultando ou impedindo a captação do óvulo adequadamente, pela interferência no desenvolvimento do óvulo ou na fase embrionária inicial, e pelo endométrio não tão receptivo ao embrião (revisado por NAVARRO *et al.*, 2003).

Infertilidade por fator tubário – lesões dificultam ou impossibilitam a passagem de espermatozóides, resultando na não fecundação do gameta feminino. O tratamento por FIV é indicado em bloqueio tubário, adesão pélvica severa ou em retirada das trompas bilateralmente (revisado por VELA *et al.*, 2009).

Ausência de ovulação – pacientes com clínica de hipogonadismo hipotalâmico e síndrome do ovário policístico são os casos indicados para FIV (THESSALONIKI, 2008). Neste grupo clínico a gravidez múltipla é mais rara, porém a estimulação ovariana é complicada, já que as pacientes podem sair de uma clínica de baixa resposta a estimulação para uma hiperestimulação ovariana (revisado por VELA *et al.*, 2009).

Infertilidade imunológica – há no soro materno anticorpos anti-espermatozóides, que podem alterar sua mobilidade e interação com a mucosa cervical, impedindo a fertilização do oócito tanto *in vivo* como *in vitro* (BRONSON, 1990). Para contornar esta situação, técnicas como a remoção dos anticorpos ligados ao espermatozóide e a facilitação da fertilização pela inseminação por ICSI são adotadas (LOMBARDO *et al.*, 2004).

Fator masculino – a infertilidade masculina responde por aproximadamente 20% da busca ao tratamento por TRA. Acredita-se que a mesma possa estar presente em cerca de 30 a 40% dos casais inférteis que recorrem à TRA, segundo a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva. A abordagem para tratamento desta causa de infertilidade depende da quantidade e qualidade dos espermatozóides. Em casos leve a moderado de oligospermia

(baixa contagem de espermatozoides no ejaculado) e/ou astenospermia (baixa motilidade do espermatozoide) a IA pode ser adotada, mas em casos severo a indicação é ICSI.

Infertilidade sem causa conhecida – as causas não são definidas para aproximadamente 30% da população infértil. As opções terapêuticas são controversas, não tendo sido demonstrado diferenças entre os tratamentos de FIV, IA com ou sem estimulação ovariana, transferência intrafalopiana do gameta e administração de citrato de clomifeno (substância administrada em caso de infertilidade feminina, estimula a ovulação) (PANDIAN *et al.*, 2005).

2.2. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

Genes altamente polimórficos e outros monomórficos estão localizados no braço curto do cromossomo 6, 6p21.3, em região denominada por MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex* (MEHRA e KAUR, 2003).

Os genes *HLA* codificam produtos protéicos que apresentam um papel importante no reconhecimento de moléculas próprias e não próprias, seja durante a educação tímica dos linfócitos T e/ou no curso de infecções e transplantes de tecidos sólidos. Sua função apresentadora de peptídeos durante o reconhecimento imune frequentemente resulta em ativação de linfócitos T desencadeando uma reação de resposta imune positiva contra o agente patogênico ou a rejeição de tecidos órgãos transplantados (VAN DER VEN *et al.*, 2000) (Figura 2).

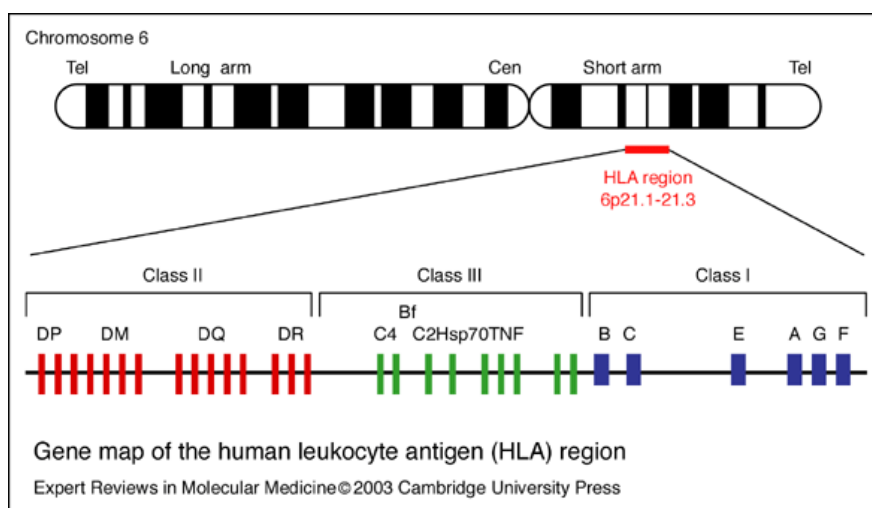


Figura 2: Localização do sistema HLA no cromossomo 6 (6p21.3). Fonte: MEHRA e KAUR, 2003

Mais recentemente tem sido enfatizada a participação de proteínas HLA de Classe I em outros mecanismos de imunovigilância por meio da interação de epítomos presentes nas proteínas HLA-G, HLA-C e epítomos Bw4 com receptores específicos expressos na membrana das células NK.

O Sistema Gênico *HLA* codifica proteínas com propriedades imunológicas similares, mas estruturalmente diferentes, e classificam-se em:

- Genes HLA de Classe I: genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* codificam proteínas de classe I presentes em todas as células nucleadas, referidas como moléculas clássicas ou Ia. Os genes *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* codificam produtos referidos como não-clássicos ou Ib. Esses produtos moleculares, constituídos por um polipeptídio α , que contem três domínios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), compõem uma estrutura tridimensional associando-se com um outro polipeptídio, beta-2 microglobulina (β_2m), codificado por gene de mesmo nome situado no cromossomo 15. As proteínas HLA de Classe I interagem com linfócitos T citotóxicos ou TCD8⁺ (MEHRA e KAUR, 2003).

- Genes HLA de Classe II: *HLA-DR*, *HLA-DQ*, e *HLA-DP* codificam proteínas de classe II de mesmo nome, presentes na superfície de linfócitos B e células apresentadoras de antígenos (APC), tais como macrófagos e células dendríticas. Esses produtos protéicos são heterodímeros constituídos por um polipeptídio α , com dois domínios ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), e um peptídeo β , também com dois domínios ($\beta 1$ e $\beta 2$) (MEHRA e KAUR, 2003). As proteínas HLA de Classe II interagem com linfócitos T auxiliares ou TCD4⁺, apresentando peptídeos exógenos de origem extracelular. Os produtos moleculares codificados pelos genes *HLA-DM*, *HLA-DZ/DO* não se expressam na membrana das células mas participam de etapas importantes no carregamento e processamento dos peptídeos.

- A região gênica conhecida como de classe III, contém uma variedade de genes, em sua maioria relacionados com funções imunes, dentre os quais genes que codificam citocinas como a linfotóxina α (*LTA*), fator de necrose tumoral (*TNF*) e linfotóxina β (*LTB*), bem como genes que codificam proteínas do sistema complemento das vias clássicas, que interagem com o complexo antígeno-anticorpo para promover a lise celular na resposta humoral, e genes que codificam proteínas da via alternativa do complemento (MEHRA e KAUR, 2003).

2.3. HISTÓRICO DO *HLA-G*

Geraghty *et al.*, em 1987, caracterizaram por clonagem uma sequência genômica não MHC de Classe Ia localizada num fragmento de restrição de 6.0 kilobases, razão pela qual foi referida inicialmente como *HLA-6.0*. Posteriormente foi designada *HLA-G* por apresentar organização gênica semelhante aos genes *HLA* classe I clássicos: 8 exons, 7 introns e 1 região 3'UTR.

Ellis *et al.*, 1990, classificaram o *HLA-G* como um gene que codifica moléculas de classe I não clássicas. Seu importante papel na interação materno-fetal já havia sido relatado por Ellis *et al.*, 1990, porém seu mecanismo de ligação aos receptores inibidores das células NK, do tipo *Killer cell immunoglobulin like receptor* (KIR), especificamente ao receptor KIR2DL4, receptores inibidores leucocitários semelhantes às imunoglobulinas (LIR)-1 e LIR-2, ou interagindo com a molécula HLA-E, que se liga ao receptor CD94/NKG2, foi descrito posteriormente por Navarro *et al.*, 1999.

2.4. ESTRUTURA DO GENE

O estudo da estrutura gênica de *HLA-G* revelou sua similaridade com genes *HLA* de classe I. No entanto, uma discrepância observada entre os genes clássicos e o *HLA-G* foi a presença de um códon de término de tradução no sexto exon, o que resulta em uma proteína com uma cauda citoplasmática mais curta, com apenas 6 aminoácidos, ao invés dos 30 apresentado pelas moléculas clássicas.

Os exons 2, 3 e 4 do gene *HLA-G* codificam os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da cadeia α da molécula HLA-G, sendo que os 2 primeiros domínios definem a fenda para ligação do peptídeo, enquanto no domínio $\alpha 3$ situam-se os epítomos ligantes para receptores LIR-1 e LIR-2. Tais receptores são funcionalmente relacionados aos receptores inibidores KIR de células NK. A ligação de LIRs ou KIRs com moléculas de classe I resulta em sinais inibidores da ativação de células NK. Esta possível função é distinta daquela exercida pela região $\alpha 3$ nas moléculas de classe I clássicas, que é interagir com a β_2m (LEE *et al.*, 1995; DIEHL *et al.*, 1996). À semelhança dos antígenos MHC de Classe I clássicos nos quais certos resíduos estão em posições conservadas e situam-se em posições estratégicas para

interação com linfócitos T CD8⁺, essas regiões conservadas também são observadas na proteína HLA-G e HLA-E (GAO *et al.*, 1997).

Bjorkman *et al.*, em 1987, definiram 15 aminoácidos que poderiam interagir diretamente com o receptor de células T CD8⁺, por estarem expostos no domínio de ligação do antígeno. Destes, 2 são altamente variáveis, 6 moderadamente variáveis e 7 conservados. Dentre esses últimos, 6 são idênticos entre *HLA-A2* e *HLA-G*, o que sugere que HLA-G possa participar de mecanismos efetores da resposta imune adaptativa, interagindo com linfócitos T citotóxicos.

A ausência da molécula HLA-A, para interagir com os receptores de células T no trofoblasto e a presença de moléculas HLA-G, levam a hipotetizar que a proteína HLA-G participe de outra via de imunovigilância mediada por células NK, através da interação com receptores KIR2DL4 expressos na membrana das células NK (KOVATS *et al.*, 1990), o que resultaria na tolerância fetal pelo organismo materno.

Além do mecanismo de prevenção da lise por células NK CD56⁺, sugere-se que a proteína HLA-G possa induzir células T $\gamma\delta$ a suprimir a rejeição do feto via células T CD8⁺ citotóxicas ou, ainda, por efeito supressor da proteína solúvel de HLA-G nas células T (DIEHL *et al.*, 1996).

2.5. PROTEÍNA HLA-G, ISOFORMAS E FUNÇÃO

O transcrito do mRNA de HLA-G pode resultar em diferentes isoformas protéicas por meio do processamento alternativo (Figura 3). Algumas dessas isoformas são ligadas a membrana (HLA-G1, G2, G3 e G4) enquanto outras são isoformas solúveis (HLA-G5, G6 e G7) (LE BOUTEILLER e BLASCHITZ, 1999). As formas solúveis resultam da manutenção do íntron 2 ou 4 durante o processamento do mRNA. O transcrito maduro resultante possui um códon de término de tradução prematuro (UGA), que codifica uma proteína sem a região responsável pela ligação da molécula à membrana (BLASCHITZ *et al.*, 2005). Estas isoformas apresentam diferentes níveis de expressão, os transcritos relacionados a HLA-G3, HLA-G4 e HLA-G7 são raros nas placentas. HLA-G1 e G2/G6 localizam-se na interface entre o trofoblasto e a decídua; enquanto HLA-G5 está presente em várias sub-populações de células do trofoblasto, a proteína pode estar ou não associada com a cadeia leve da β_2m (MORALES *et al.*, 2007).

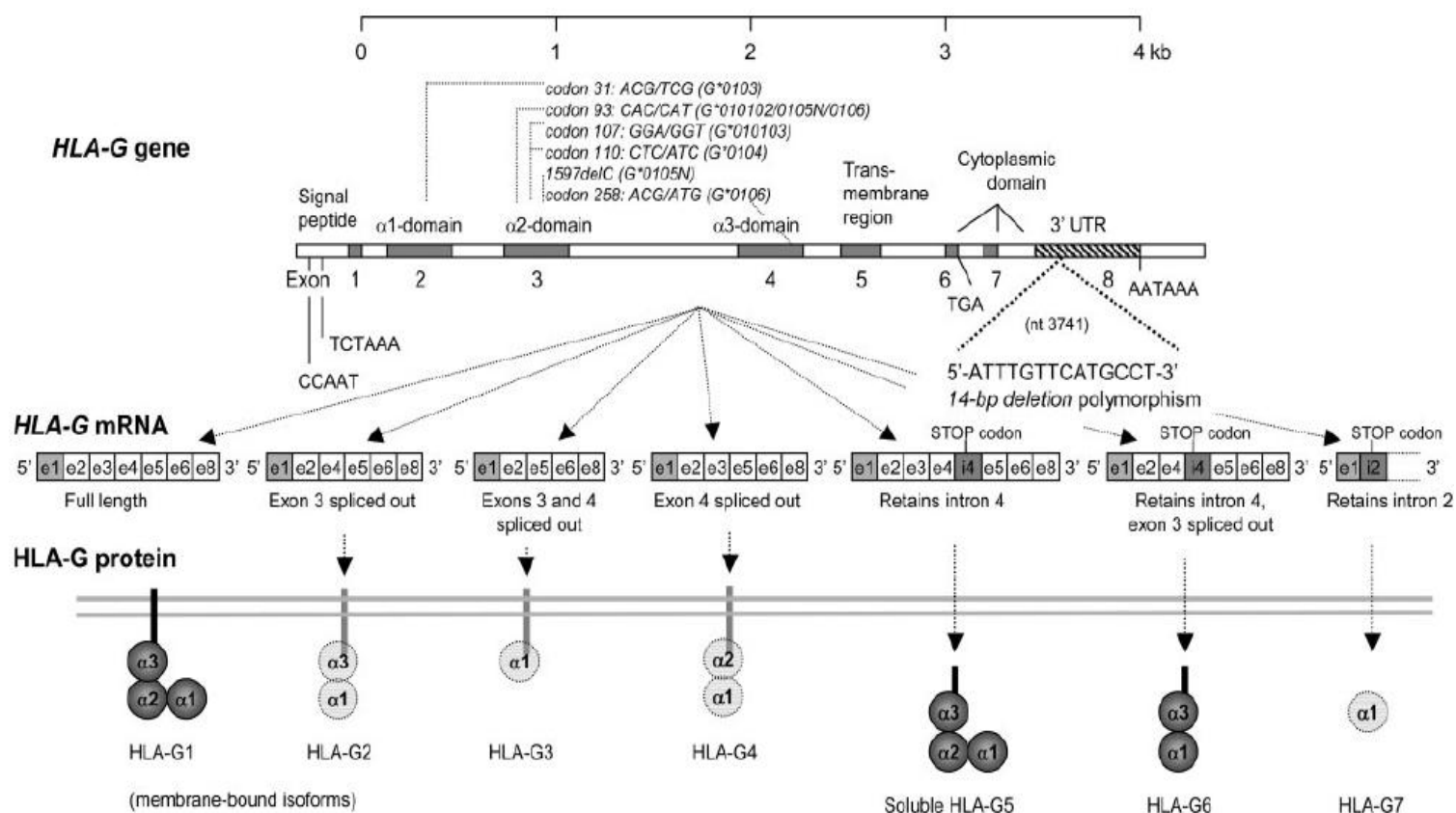


Figura 3: Estrutura e composição das isoformas do HLA-G. Fonte: HVIID et al., 2006a.

Moléculas sHLA-G são encontradas no sangue periférico de homens e mulheres saudáveis, no sangue do cordão umbilical e no fluido amniótico, sendo consideradas como mediadoras da tolerância imunológica e principalmente da tolerância materno-fetal (REBMANN *et al.*, 2001).

A forma G1 solúvel, resultado da inclusão do íntron 4, é conhecida como G5, e foi estudada por Rebmann *et al.*, em 1999, como a principal responsável pelas trocas metabólicas entre o organismo materno e o fetal, uma vez que tem sido observado o aumento dos níveis séricos dessa isoforma durante a gestação. De acordo com Fuzzi *et al.*, em 2002, a molécula HLA-G5 pode ser secretada por células embrionárias e não somente por células maternas. Como resultados de seus estudos pode-se observar a presença dessa isoforma de HLA-G em cultura de embriões *in vitro*, sendo que conclusões similares foram obtidas por Kotze *et al.* e Rebmann *et al.*, conforme consta em literatura publicada em 2010. Por outro lado Van Lierop *et al.*, em 2002, não detectaram a presença de sHLA-G em cultura de embriões antes da implantação, o que se contrapõe aos achados de Fuzzi *et al.*, 2002.

Os níveis plasmáticos do sHLA-G são diretamente influenciados pelos alelos do gene *HLA-G*. Segundo Rebmann *et al.*, em 2001, os indivíduos portadores do grupo alélico *HLA-A11*, apresentam baixos níveis de sHLA-G, o que pode também ser inferido pelo

desequilíbrio de ligação positivo entre alelos dos genes *HLA-A* e *HLA-G*. Da mesma forma, baixos níveis de sHLA-G têm sido observados na presença dos alelos *HLA-G*01:01:03* e do alelo *HLA-G*01:05N*. O alelo *HLA-G*01:04:01* tem sido relacionado a altos níveis séricos de sHLA-G, assim como o *HLA-G*0101g*, enquanto níveis intermediários tem sido associados aos alelos *HLA-G*01:01:08* e *HLA-G*01:04b*.

Hviid *et al.*, em 2003, relacionaram os alelos baixo secretores descritos por Rebmann *et al.*, em 2001, com a presença dos 14pb (ins14pb) no exon 8 do *HLA-G*, enquanto nos alelos alto secretores esta sequência (del14pb) estava deletada.

A concentração plasmática de sHLA-G foi avaliada por teste de Elisa, em famílias informativas, tipificadas para *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* e *HLA-G*, onde foi possível realizar também análises de segregação de haplótipos HLA, bem como para os alelos *HLA-G* referidos como alto e baixo secretores, conforme apresentado na Tabela I (REBMANN *et al.*, 2001).

Tabela I: Associação de alelos *HLA-G* com as formas sHLA-G e níveis solúveis de HLA de Classe I.

HLA-G*	n ¹	sHLA-G (ng/ml)		Teste t	Pc	sHLA-I (ng/ml)		Teste t	Pc
		média	SEM			média	SEM		
01011	66	27,0	2,1			573,0	53,4		
01012	34	28,4	3,2			659,4	93,4		
01013	17	8,1	1,7	<0,0001	<0,001	666,0	106,9		
01018	6	26,6	3,9			733,2	252,6		
0101g	1	49,9				1082,0			
01031	7	31,3	6,3			733,0	191,2		
01041									
0104b									
0105N									

¹ Frequência de alelos *HLA-G* individuais, para homozigotos ou heterozigotos. Nenhum indivíduo testado foi homozigoto para os alelos *HLA-G*01013*, *G*0101g*, *G*01031*, *G*01041* e *G*0105N*, respectivamente

Fonte: Adaptada de Rebmann *et al.*, 2001

2.6. REGULAÇÃO DO GENE *HLA-G*

Os genes MHC classe I e II apresentam similaridades em suas regiões promotoras. Em linhagens celulares de pacientes deficientes em moléculas MHC classe II, observou-se expressão diminuída das moléculas MHC de classe I, sugerindo que a regulação dos genes MHC-I estaria sobre o controle de reguladores transcricionais da expressão dos genes MHC de classe II (SABATIER *et al.*, 1996). O fator transcricional ativador de classe II (CIITA) apresentou atividade de ativação transcricional nos promotores de classe I por

meio de sua ligação à sequências do *Sítio α* , que também é alvo de ligação de proteínas reguladoras ATF (ativador de fator transcricional; (AMPc) (CREB - proteína ligante ao elemento da adenina mono fosfato cíclica) (GOBIN *et al.*, 1997a). Esta sequência do promotor de MHC classe I é homóloga ao *box X2* dos promotores gênicos de MHC classe II (MORENO *et al.*, 1995).

Existe uma sequência homóloga ao *box X2* a 5' do *sítio α* no promotor de MHC classe I, e sequências homólogas ao *box W/S*, presente no promotor de MHC classe II. O *Box CCAAT* invertido, presente nas sequências *enhB* do promotor MHC classe I, é idêntico ao *box Y* do promotor de classe II (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1998a). O complexo ATF/CREB-*sítio- α* e a sequência 3' flangeadora do *interferon specific regulation element* (ISRE) são cruciais para os elementos regulatórios a 5' no promotor do MHC classe I (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1998a).

Os elementos regulatórios conservados no promotor dos genes MHC de classe I clássicos, intensificador A (*enhA*), ISRE, o *sítio α* e intensificador B (*enhB*) (BLANCHET *et al.*, 1992), não se apresentam conservados nas regiões reguladoras dos genes MHC classe I não-clássicos, o que poderia modificar a afinidade pelos fatores transcricionais e suas subunidades (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1998b). No promotor de *HLA-G*, o *enhA* apresenta apenas as sequências iniciais na extremidade 5' e o restante deletado, assim como toda a sequência ISRE (GERAGHTY *et al.*, 1987). O *sítio α* e o *box Y* também divergem da sequência apresentada nos promotores dos genes clássicos (BOSS, 1997; GOBIN *et al.*, 1998) e há uma região a 5' do exon 1 (1,1kb) que direciona a transcrição específica de *HLA-G*, e por essa razão investigada como candidata à regulação tecido específica da expressão de *HLA-G* (SCHMIDT *et al.*, 1993).

Como consequência da sequência deletada no *enhA*, a expressão de *HLA-G* pode apresentar propriedades de ligação alteradas ao se ligar apenas à subunidade p50 (GOBIN *et al.*, 1997b), um dos cinco membros da família do fator transcricional kapa-B (NF- κ B) (p65, p52, c-Rel e RelB), que interage em dois sítios de ligação na sequência completa do *enhA* (THANOS E MANIATIS, 1995).

A sequência ISRE possibilita a regulação da expressão basal ou induzida de genes MHC de Classe I e II pela interação com o interferon gama (IFN- γ) (GOES *et al.*, 1995). Isso não acontece no promotor de *HLA-G*, onde alterações nas sequências do módulo S-X-Y, determinam a não resposta ao IFN- γ , bem como ao CIITA.

O fator transcricional fator regulatório de interferon (IRF-1) atua como um ativador de transcrição de *HLA-G* (HOBART *et al.*, 1997) e tem função antagônica a IRF-2

e ICSBP (NELSON *et al.*, 1993). Por apresentar afinidade também pelo ISRE sugere-se uma possível regulação da expressão gênica de *HLA-G* através de outros elementos regulatórios, tais como sítios adicionais de resposta a IRF-1 e 2 e possíveis sítios de ligação para proteínas com módulos transativadores tipo “dedo de zinco”. No entanto, *HLA-G* não é regulado por *zinger finger X* (ZFX) (GOBIN *et al.*, 1998). A ativação da expressão induzida pelo IFN- β pode estar associada a um elemento funcional localizado a -746 pares de bases do códon ATG inicial, no promotor do gene *HLA-G* (LEFEBVRE *et al.*, 1999).

O perfil de metilação pode ser uma forma de silenciamento dos genes MHC classe I clássicos no trofoblasto, porém não há evidências de dinucleotídeos metilados nas ilhas CpG nos promotores dos genes de classe I clássicos presentes, mas não expressos, no trofoblasto *in vivo* (LE BOUTEILLER e LENFANT, 1996).

Pela ausência de evidências de regulação tecido específica na região promotora de 1500 pares de bases do gene *HLA-G*, sugere-se que os fatores reguladores da expressão gênica de *HLA-G* no trofoblasto possam ser fatores imunoreguladores secretados pela placenta. A interleucina (IL)-10 tem sido estudada como uma candidata a imunoregulação, sendo responsável pelo controle da expressão de *HLA-G*. Nesse contexto, IL-10 recrutaria proteínas específicas para a regulação do processo fisiológico da tolerância imune durante a gestação, atuando como *enhancer* da expressão de *HLA-G* (MOREAU *et al.*, 1999). Outras interleucinas, como IL-2, IL-4, IL-13, INF- γ e TNF- α não induziriam a expressão de *HLA-G* nas células NK (BENSUSSAN *et al.*, 1995).

Na região promotora do *HLA-G*, localiza-se entre as posições - 486 e -477, sequências reguladoras em *cis* (*Heat shock element* (HSE) que atuam como sítio de ligação para o fator transcricional *Heat shock factor 1* (HSF1) (IMBRAIM *et al.*, 2000). A sequência HSE constitui-se de repetições pentanucleotídicas (nGAAn), arrançadas em orientação alternativa, e estão presentes na região promotora de genes que codificam para proteínas de choque térmico (YAMAMOTO *et al.*, 2005). Estes elementos não estão presentes nas regiões promotoras de *HLA-A*, *-B*, *-E* e *-F* (IMBRAIM *et al.*, 2000; RIZZO *et al.*, 2009b).

2.7. POLIMORFISMOS DO GENE *HLA-G*

2.7.1. Polimorfismos da região codificadora

Em consulta aos dados registrados no IMGT/HLA, em outubro de 2015, haviam sido descritos 50 alelos, 16 proteínas e 2 alelos nulos de *HLA-G*. As variações na região codificadora do gene *HLA-G*, estão apresentadas na Tabela II, o exon 1 não está representado, apesar de haver 2 polimorfismos descritos, pois estas variações ocorrem mais a 5' (*upstream*) do códon de início da tradução, na terceira base do codon -20 (G por A) e na terceira base do códon -13 (G por A). Na tabela, pode-se observar que os exons mais polimórficos são o exon 2, o 3 e o 4, determinantes na diferenciação dos alelos.

No exon 3 a primeira base do códon 130 (C) apresenta-se deletada no alelo G*01:05, o que resulta em uma troca de matriz a partir desta base no exon 3, produzindo uma proteína HLA-G1 truncada, assim sendo considerado este alelo como um alelo nulo (VAN DER VEN *et al.*, 1994). Apesar da isoforma G1 estar truncada indivíduos homozigotos para este alelo apresentam reprodução normal, evidenciando que o produto desse gene, talvez não seja essencial para a sobrevivência (OBER *et al.*, 1998), ressaltando assim que uma isoforma funcional (HLA-G2) pode compensar a isoforma truncada, já que a mutação neste alelo não altera a proteína HLA-G2, que não contém o exon 3 em seu transcrito (OBER e ALDRICH, 1997; HVIID, 2006a)

No codon 110 do exon 3, ocorre também uma substituição não sinônima (alteração de aminoácido) que resulta no alelo G*01:04 (revisado por HVIID, 2006a), enquanto no códon 31 do exon 2 o alelo G*01:03 é caracterizado por uma substituição silenciosa de base, quando comparado aos alelos G*01:01 e G*01:02 (troca de base no códon 54 no exon 2), porém não se descarta um possível códon de parada à 5' desta variação nucleotídica (REBMANN *et al.*, 2001). Outra substituição de aminoácido resulta na alteração no códon 258 do exon 4, originando o alelo G*01:06 (revisado por HVIID, 2006a).

Tabela II: Polimorfismos da região codificadora de *HLA-G* (exon 2, 3, 4 e 5).

AA Codon	11	12	13	27	31	32	35	41	54	55	57	69	93	100	104	105	107	110	117	130	148	159	169	171	185	188	211	219	236	258	267	290	309	
	Exon 2												Exon 3										Exon 4								Exon 5			
G*01:01:01:01	GCC	GTG	TCC	TAC	ACG	CAG	CGG	GCG	CAG	GAG	CCG	GCC	CAC	GGC	GGG	TCC	GGA	CTC	GCC	CTG	GAG	TAC	CAC	TAC	CCC	CAC	GCG	CGG	GCA	ACG	CCG	GGC	AGA	
G*01:01:01:02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G*01:01:01:03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G*01:01:01:04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G*01:01:01:05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G*01:01:01:06	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G*01:01:02:01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	--G	
G*01:01:02:02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	--G	
G*01:01:03:01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	
G*01:01:03:02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	
G*01:01:03:03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	
G*01:01:04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***	***	***	***	***	***	***
G*01:01:05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G*01:01:06	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	--G
G*01:01:07	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***
G*01:01:08	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G*01:01:09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G*01:01:11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***
G*01:01:12	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G
G*01:01:13	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	***	***	***	***	***	***	***	***
G*01:01:14	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***
G*01:01:15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***
G*01:01:16	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***
G*01:01:17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	--T	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	***	***
G*01:01:18	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	***	***
G*01:01:19	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	***	***
G*01:01:20	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	--G	

2.7.2. Polimorfismos da região reguladora

Polimorfismos importantes também estão presentes nas regiões 5'UTR e 3'UTR, os quais têm sido associados com a regulação gênica e níveis de expressão de HLA-G (HVIID *et al.*, 2006b).

2.7.2.1. Variações na região 5'UTR

Na posição -725 observa-se a substituição de bases nucleotídicas, C por G ou por T (OBER *et al.*, 2003). A substituição por G já foi relacionada à regulação da expressão de *HLA-G*, uma vez que existe na posição -726 uma C. Na posição -201, observa-se a troca de G por A nos alelos *HLA-G*01:01:02*, *G*01:01:03*, *G*01:04*, *G*01:05N* e *G*01:06*. Nesta região localiza-se o *enh A*, onde se liga o fator transcricional NF- κ B2, especificamente no sítio κ B2 (HVIID *et al.*, 1999). Na figura 4 pode-se observar a posição destes e de outros SNPs da região 5'UTR e os sítios de regulação da expressão do *HLA-G*.

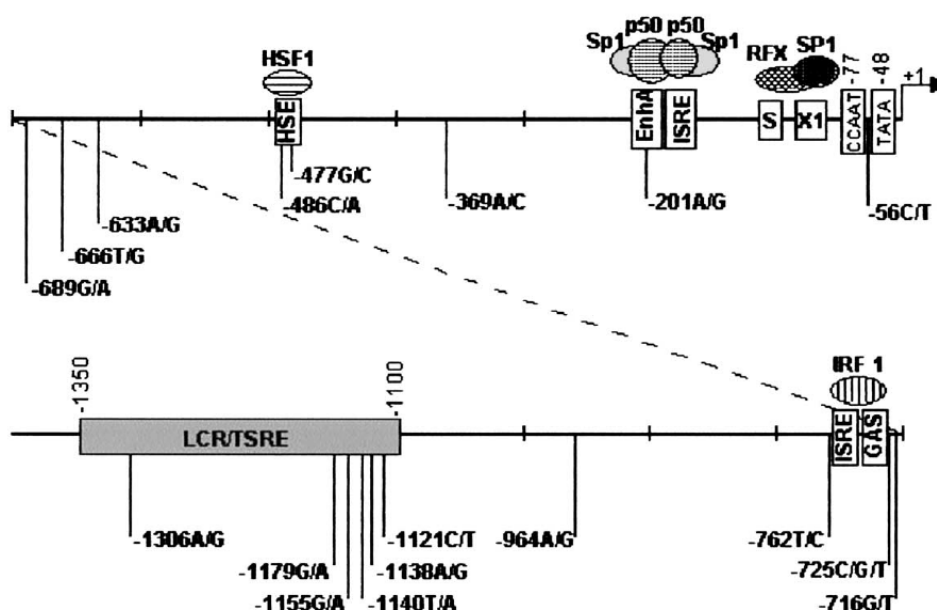


Figura 4: Polimorfismos da região 5'UTR do gene *HLA-G* e os sítios de ligação dos fatores transcricionais reguladores da expressão do gene. Fonte: Ober *et al.*, 2003.

Os SNPs desta região foram nomeados por Castelli e cols, 2011, como alelos porém não há em banco de dados uma nomenclatura oficial até o momento.

2.7.2.2. Variações na região 3'UTR

Na região 3'UTR do *HLA-G* ocorre um polimorfismo de inserção/deleção de 14 pares de bases (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3'), no exon 8 (HARRISON *et al.*, 1993), que pode influenciar na estabilidade do mRNA (BOHJANEN *et al.*, 1991). Hviid *et al.*, 2003, observaram que há uma relação entre a deleção dessas bases e diferenças no *splicing* alternativo das isoformas de *HLA-G* e nos seus níveis de expressão.

As posições +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 C/A, +3035 C/T (CASTELLI *et al.*, 2009), +3142 C/G (TAN *et al.*, 2007), +3187 A/G (YIE *et al.*, 2008) e +3196 C/G (CASTELLI *et al.*, 2009) estão associadas com atividade de regulação de expressão de *HLA-G* pela interação com microRNAs, que são pequenos RNAs envolvidos na regulação da expressão gênica pós-transcrição (CHUA *et al.*, 2009). A transcrição do alelo +3142G, resulta num mRNA com maior afinidade com os microRNA *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-148b* e *hsa-miR-152*, associando a presença dessa variação alélica com a regulação inibitória da expressão de *HLA-G*. Por sua vez, essa variante alélica apresenta-se em desequilíbrio de ligação com o alelo -964G (TAN *et al.*, 2008). A base A na posição +3187 *in vitro* foi associada a diminuição da estabilidade do mRNA, e a baixa expressão de *HLA-G* (YIE *et al.*, 2008).

2.8. INFLUÊNCIA DO *HLA-G* NA REPRODUÇÃO

O *HLA-G* apresenta uma regulação tecido específica, se comparada aos demais genes HLA de classe I. Desta forma, sua expressão já foi observada na interface materno-fetal (GERAGHTY *et al.*, 1987; ELLIS *et al.*, 1986), no fígado, olhos, coração, pulmão e rins fetais, além do timo, queratinócitos, células B e T, baço, fígado e rins em adultos (LE BOUTEILLER, 1994).

A interface materno-fetal apresenta características imunológicas específicas, devido à presença do trofoblasto, uma camada que reveste o blastocisto e contribui para a formação da placenta. As células trofoblásticas expressam *HLA-C* (único gene de classe I clássico expresso na interface), *HLA-E* e *HLA-G*, porém não são encontradas moléculas HLA clássicas (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DR*, *HLA-DQ* e *HLA-DP*) (HUNTER *et al.*, 1998; LE BOUTEILLER *et al.* 1999). Os altos níveis de expressão de *HLA-G*, nesta interface, parecem estar associados a uma atividade imunomoduladora fundamental na fisiologia gestacional (KING *et al.*, 1996).

A tabela III mostra alguns estudos publicados sobre a influência da molécula *HLA-G* em alguns processos, tais como: abortamento espontâneo de repetição (AER) (HVIID *et al.*, 2002; ABBAS *et al.*, 2004; TRIPATHI *et al.*, 2004; ABBAS *et al.*, 2006; YAN *et al.*, 2006a; YAN *et al.*, 2006b; XUE *et al.*, 2007; VARGAS, 2011), pré-eclampsia (HYLENIUS *et al.*, 2004; VIANNA *et al.*, 2007; IVERSEN *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2008; YIE *et al.*, 2008), reprodução *in vitro* (FUZZI *et al.*, 2002; VAN LIEROP *et al.*, 2002; HVIID *et al.*, 2004a; HVIID *et al.*, 2004c; NOCCI *et al.*, 2005; YAO *et al.*, 2005; SHER *et al.*, 2005; SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2007; REBMANN *et al.*, 2007; BORGATTI *et al.*, 2008; VERCAMMEN *et al.*, 2008; SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2009; KOTZE *et al.*, 2010; REBMANN *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012), características do embrião a ser selecionado (JURISICOVA *et al.*, 1996; HUNT *et al.*, 2000; HVIID *et al.*, 2003; ROUSSEAU *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2008) e características do recém nascido (HVIID *et al.*, 2004b).

Tabela III: Revisão dos estudos que investigam *HLA-G* e sua influência em diferentes etapas do processo reprodutivo.

Autores (ano)	População e condição estudada	Processo associado	Regiões do <i>HLA-G</i> estudada	Resultado da associação
Juriscova <i>et al.</i> (1996)	Canadá FIV	Expressão do <i>HLA-G</i> e as taxas de clivagem dos embriões	mRNA do <i>HLA-G</i> e cadeia de microglobulina β_2	Expressão do <i>HLA-G</i> está associada com a implantação do embrião
Hunt <i>et al.</i> (2000)	EUA Sucesso gestacional	Isoformas solúveis de <i>HLA-G</i> no sangue materno	Isoformas solúveis de <i>HLA-G</i>	Ausência da isoforma <i>HLA-G1</i> solúvel não é indispensável no sucesso gestacional.
Fuzzi <i>et al.</i> (2002)	Itália FIV	s <i>HLA-G</i> e FIV	Isoforma <i>HLA-G5</i> ou <i>G1</i> solúvel	A expressão de <i>HLA-G</i> é essencial para a implantação.
Van Lierop <i>et al.</i> (2002)	FIV	s <i>HLA-G</i> e FIV	Isoforma <i>HLA-G5</i> ou <i>G1</i> solúvel	A expressão de <i>HLA-G</i> não interfere na implantação.

Tabela III: Continuação

Hviid <i>et al.</i> (2002)	Dinamarca AER	AER	+14/-14bp exon 8	Genótipo +/+14bp é mais frequente em mulheres do que em homens no grupo paciente
Hviid <i>et al.</i> (2003)	Dinamarca FIV	Alelos HLA-G e nível de mRNA no primeiro trimestre de células trofoblásticas.	mRNA do HLA-G, alelos <i>HLA-G</i> e - +14/-14bp exon 8	Alelos com a inserção de 14bp são baixos secretores de mRNA de <i>HLA-G</i> .
Rousseau <i>et al.</i> (2003)	França Estabilidade do mRNA	mRNA em células de coriocarcinoma de JEG-3 e de melanoma M8	+14/-14bp exon 8	mRNA sem os 14bp são mais estável que os que apresentam os 14bp
Abbas <i>et al.</i> (2004)	Índia AER	AER	Exon 2 e exon 3	HLA-G*010103, *010105, *010108 e *0105 encontrados em pacientes com AER, e *010107 ausente neste grupo
Hylenius <i>et al.</i> (2004)	Dinamarca Pré-eclampsia	Pré-eclampsia	+14/-14bp exon 8	Genótipo +/+14bp no feto associado com pré-eclampsia
Hviid <i>et al.</i> (2004a)	Dinamarca FIV	FIV	+14/-14bp exon 8	Genótipo +/+14bp associado com o sucesso no tratamento
Hviid <i>et al.</i> (2004b)	Dinamarca Peso do feto	Peso ao nascer	+14/-14bp exon 8	Genótipo +/+14bp associado com um maior peso ao nascer
Hviid <i>et al.</i> (2004c)	Dinamarca FIV	Isoformas G1 e G5 e FIV	Região 5'URR e 3'UTR	Polimorfismos nessas regiões podem influenciar a expressão de sHLA-G, sendo importante para o sucesso da gravidez
Tripathi <i>et al.</i> (2004)	Índia AER	AER	+14/-14bp exon 8	NS ¹
Nocci <i>et al.</i> (2005)	Itália FIV	sHLA-G e FIV	Isoforma HLA-G5 ou G1 solúvel	A expressão de HLA-G é essencial para a implantação.
Sher <i>et al.</i> (2005)	EUA FIV	Expressão de HLA-G e FIV	Isoforma HLA-G5 ou G1 solúvel	Expressão de sHLA-G é o verdadeiro marcador de qualidade de embriões.
Yao <i>et al.</i> (2005)	Inglaterra FIV	Expressão de HLA-G e FIV	Isoforma HLA-G5 ou G1 solúvel	Expressão de sHLA-G não é o mais importante marcador de qualidade de embriões.
Abbas <i>et al.</i> (2006)	Índia AER	Expressão do HLA-G e AER	Isoformas HLA-G1, G2 , G3 e G4	NS
Yan <i>et al.</i> (2006a)	China AER	AER	+14/-14bp exon 8	NS

Tabela III: Continuação

Yan <i>et al.</i> (2006b)	China AER	AER	Exon 2, exon 3 e exon 4	NS
Rebmann <i>et al.</i> (2007)	Alemanha FIV	Expressão de HLA-G e FIV	Isoforma solúvel HLA-G	Expressão de sHLA-G é importante na identificação e seleção de embriões.
Sipak-Szmigiel <i>et al.</i> (2007)	Polônia AER e FIV	AER e FIV	Exon 2, exon 3 e exon 4	Alelos <i>HLA-G</i> influenciam nos níveis de sHLA-G, e altas concentrações de sHLA-G são importantes para um bom prognóstico em FIV
Xue <i>et al.</i> (2007)	China AER	AER	+14/-14bp exon 8	NS
Vianna <i>et al.</i> (2007)	Brasil Pré-eclampsia	Pré-eclampsia	+14/-14bp exon 8	Genótipo -/-14bp tem efeito protetor contra pré-eclampsia
Borgatti <i>et al.</i> (2008)	Itália FIV	FIV	sICAM ²	Biomarcador para seleção dos embriões
Chen <i>et al.</i> (2008)	China Níveis de sHLA-G	Expressão de sHLA-G	+14/-14bp exon 8	Menos expressão de sHLA-G nos homozigotos com a presença dos 14bp
Iversen <i>et al.</i> (2008)	Noruega Pré-eclampsia	Pré-eclampsia	+14/-14bp exon 8	NS
Tan <i>et al.</i> (2008)	Singapura e Malásia Pré-eclampsia	Alelos paternos na pré-eclampsia	Exon 2, exon 3 e exon 4	HLA-G*0106 paterno aumenta a suscetibilidade à pré-eclâmpsia
Vercammen <i>et al.</i> (2008)	Bélgica FIV e ICSI	Nível do sHLA-G em embriões de FIV e ICSI ³	Forma solúvel	Presença de sHLA-G aumenta a eficiência do processo de fertilização
Yie <i>et al.</i> (2008)	Canadá Pré-eclampsia	Pré-eclampsia	3'-UTR	Aumenta a suscetibilidade a pré-eclâmpsia, por instabilidade no mRNA
Sipak-Szmigiel <i>et al.</i> (2009)	Polônia FIV	FIV	Região promotora e +14/-14bp exon 8	Inserção/deleção associado com o insucesso da FIV
Kotze <i>et al.</i> (2010)	EUA ICSI	sHLA-G e ICSI	Isoforma HLA-G5 ou G1 solúvel	A expressão de HLA-G é importante para a implantação.
Rebmann <i>et al.</i> (2010)	Alemanha FIV	sHLA-G e FIV	Isoforma HLA-G5 ou G1 solúvel	A expressão de HLA-G é importante para a implantação.
Vargas (2011)	Brasil AER	AER	+14/-14bp exon 8	Genótipo +/+14bp mais frequente em controles

Tabela III: Continuação

Costa <i>et al.</i> (2012)	Brasil FIV e IA	FIV e IA ⁴	Região promotora e +14/-14bp exon 8	Inferiu haplótipos de susceptibilidade e proteção a infertilidade
Nardi <i>et al.</i> (2012)	Brasil FIV	Falha implantacional	Exon 2, 3 e 4	Alelo <i>HLA-G*01:03:01</i> mais frequente entre os casais caso; Alelo <i>HLA-G*01:04:01</i> mais frequente entre mulheres caso

¹NS: não significativo; ²ICAM: moléculas solúveis de adesão intracelular; ³ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozóide; ⁴IA: inseminação artificial.

Sabendo que a gestação é um estado fisiológico multifatorial e que por isso sofre a influência de fatores genéticos e ambientais, percebe-se a dificuldade em alcançar um consenso sobre o real papel do *HLA-G* na gestação e sobre a influência dos diferentes alelos no curso de uma gestação. Devido aos vários estudos controversos na área e devido a ausência de pesquisas em pacientes submetidos a tratamento de FIV na região sul do Brasil, faz-se necessário uma análise da relação dos polimorfismos das regiões 5'URR e 3'UTR do *HLA-G* com a eficácia da implantação do embrião após tratamento de FIV.

2.9. CÉLULAS NATURAL KILLER

Células NK são classificadas como linfócitos, pela morfologia, expressão de marcadores linfóides e origem a partir de um progenitor de células linfóides na medula óssea. Elas são componentes da resposta imune inata, não reconhecendo um antígeno específico nos receptores expressos na membrana das células infectadas (revisado por VIVIER *et al.*, 2011).

As NK são responsáveis pela síntese de citocinas, como IFN- γ , TNF- α e fator estimulador de crescimento de granulócitos (GM-CSF), e quimiocinas (PERUSSIA, 1996) necessárias para diferenciação, ativação e recrutamento de outras células do sistema imune. A ativação destas células ocorre na presença do processo de *missing self* (perda do próprio), descrito na década de 1980 (KARRE *et al.*, 1986), no qual há perda da expressão de moléculas MHC classe I, onde estão os epítomos ligantes dos receptores inibidores das células NK (KIR). Quando os ligantes não estão presentes e dependendo do balanço entre receptores de inibição e ativação, a célula alvo será interpretada como em situação anormal o

*killer (killer Ig-like receptors) (KIR) (ASHWORTH *et al.*, 1995) (FIGURA 6). Estudos mostram que receptores ativadores como NKG2 podem se apresentar como ligantes moléculas MHC classe I, comprovando que células expressando determinadas moléculas HLA classe I em excesso podem se tornar alvo de uma ativação das células NK da mesma forma que no processo de *missing self* (DIEFENBACH *et al.*, 2000; CERWENKA *et al.*, 2002).*



Figura 6: Organização genômica dos genes receptores das células NK, em humanos e ratos. (Fonte: adaptado por WILSON *et al.*, 2000).

As células NK estão presentes nos mais variados tecidos, no entanto, nem sempre apresentam os mesmos padrões de receptores expressos o que pode alterar sua funcionalidade. A diferença entre células NK do sangue periférico e as presentes na decídua (tecido uterino invadido pela placenta) (uNK) são muito bem descritas (revisado por MALE *et al.*, 2010) sendo que a principal discrepância refere-se ao receptor CD56, que em NK do sangue periférico é pouco expresso enquanto que nas uNK apresenta uma super-expressão, juntamente com grânulos citotóxicos e receptores KIR (KING *et al.*, 1993; VERMA *et al.*, 1997; SHARKEY *et al.*, 2008). Os receptores ativadores NKG2C-E, NKp30, NKp44 e NKp46 são mais expressos nas NK do sangue periférico do que nas uNK, o que resulta em menor eficiência no monitoramento de células com baixa ou expressão deficientes de MHC de classe I, pela inabilidade de polarizar grânulos citotóxicos (KING *et al.*, 1989; KOOPMAN *et al.*, 2003; KOPCOW *et al.*, 2005).

A célula uNK é o mais numeroso componente celular do sistema imune presente na decídua (60 a 70%), localizadas no epitélio glandular do endométrio e em torno das pequenas artérias (ASHKAR e CROY, 2001), seguida por macrófagos (10 a 15%), linfócitos T (10%) e sistema complemento (KING *et al.*, 1991; revisado por SARAFANA *et al.*, 2007). O aumento das uNK, principalmente, durante a implantação e estabilização da placenta na decídua, sugere um papel de mediadora da invasão trofoblática, auxiliando na

revascularização e a neoangiogênese local que são fundamentais para a implantação bem sucedida do trofoblasto (revisado por MALE *et al.*, 2010).

2.10. GENES *KIR*

O grupo de genes, que codificam para os receptores *KIR*, está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.4), no complexo de receptores de leucócitos (*leukocyte receptor complex*) (LRC) (SUTO *et al.*, 1996). Nessa região, estão também presentes outros genes que codificam receptores, membros da super família das imunoglobulinas (Ig), como os transcritos como Ig (ILT), os receptores inibidores associados a leucócitos (LIR), Fc α R (CD89) e o receptor de citotoxicidade natural NKp46 (WILSON *et al.*, 2000).

As proteínas que atuam como receptores *KIR*, assim como as demais proteínas pertencentes à superfamília das Ig, contem dois ou três domínios extracelulares tipo Ig, e que podem apresentar uma região ou cauda citoplasmática curta (*short*) (S), que apresenta motivos ativadores baseados em imunoreceptores de tirosina (*immunoreceptor tyrosine-based ativatory motifs*) (ITAM), ou longa (*long*) (L), que apresenta motivos inibidores (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) (ITIM) (OLCESE *et al.*, 1997; RAJAGOPALAN e LONG, 1999) (Figura 7).

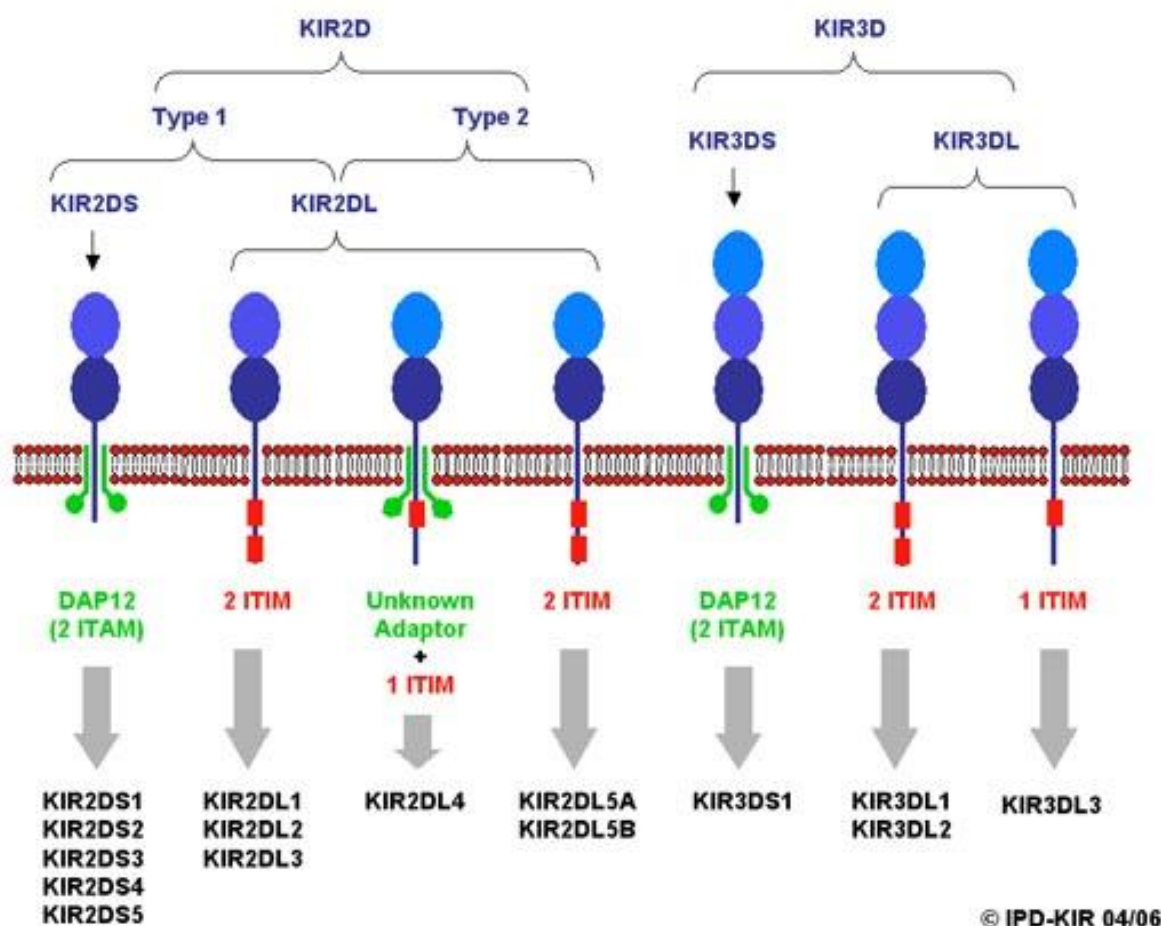


Figura 7: Representação da estrutura da proteína KIR em cada gene. Fonte: EBMT

As características da proteína, no que se refere aos domínios extracelulares, e extensão da cauda citoplasmática, são determinantes na nomenclatura destes genes, os quais são referidos pelo acrônimo KIR seguido pelos números 2 ou 3, que identificam respectivamente-se o número de domínios extracelulares se constitui de 2 ou 3 domínios, seguido pela letra D, que se refere à palavra do inglês *domain* (domínio). Logo após faz-se referência ao tamanho ou extensão da cauda citoplasmática que pode ser curta ou longa e identificada pelas letras (S: *Short*; ou L: *Long*). A informação seguinte é a do número do gene e informa a série cronológica da descrição das respectivas sequências (1-5). Em caso de grande similaridade entre as sequências gênicas coloca-se uma letra posterior ao número (A ou B), resultando assim em uma nomenclatura autoexplicativa (GOMEZ-LOZANO *et al*, 2002). Quando se tratar em caso de um pseudogene após o D coloca-se a letra P, do inglês *pseudogene* (pseudogene).

No entanto, como exceção a essas normas da nomenclatura, o gene *KIR2DL4* apresenta motivos de inibição (ITIM) e ativação (ITAM) em sua cauda citoplasmática, o que lhe confere funções simultâneas de inibição e ativação.

Os alelos KIR tem denominação semelhante aos alelos HLA, com o nome do gene sendo separado do número do alelo por um (*), os 3 primeiros dígitos referentes a variações em regiões de exon (mudanças não sinônimas), os 2 dígitos seguintes variante sinônima dentro da sequência do exon e os 2 últimos identificam polimorfismos encontrados nas regiões intrônicas, promotora ou não codificadora, ou seja, sem alteração na sequência codificadora da proteína (MARSH *et al.*, 2002) (Figura 8).



Figura 8 Nomenclatura dos alelos KIR, adotado pelo HUGO (*Human Genome Organization*). Fonte: Disponível em: EBMT.

O repertório de genes KIR herdados por um indivíduo compõe dois grupos haplotípicos principais referidos como haplótipo do grupo A e B, respectivamente. Os haplótipos do grupo A caracterizam-se pela presença de apenas um gene ativador *KIR2DS4* e, cinco genes inibidores *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*. *KIR2DL4*, também presente nesse haplótipo, pode exercer função ativadora ou inibidora (HSU *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2004) e dois pseudogenes (*KIR2DP1* e *KIR3DP1*) (UHRBERG *et al.*, 1997). No entanto, como em cada linhagem clonal de células NK pode ocorrer expressão diferencial dos genes do Haplótipo A, combinações e expressões distintas de alguns clones não estarão em outros onde, inclusive poderá não haver expressão do gene ativador *KIR2DS4*. Os haplótipos do grupo A podem ser subdivididos em A-1D, com a presença o gene *KIR1D*, originado por uma deleção no gene *KIR2DS4* após sua fixação na população, que codifica para uma proteína solúvel com domínio de Ig intacto; ou A-2DS4, onde o gene *KIR2DS4* é observado. O subgrupo A-1D é mais frequente em caucasóides (54%) quando comparado ao A-2DS4 (20%) (revisado por HSU *et al.*, 2002) (Figura 9).

Os haplótipos que compõem o grupo B, podem conter até sete genes ativadores, incluindo o gene *KIR2DL4*, (revisado por KHAKOO e CARRINGTON, 2006). Os genes *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DP1* e *KIR2DL4* são considerados genes de moldura por estarem

sempre presente na organização gênica do grupo KIR, e igualmente nos Haplótipos A e B (MARTIN *et al.*, 2000; VILCHES *et al.*, 2002) (Figura 9).

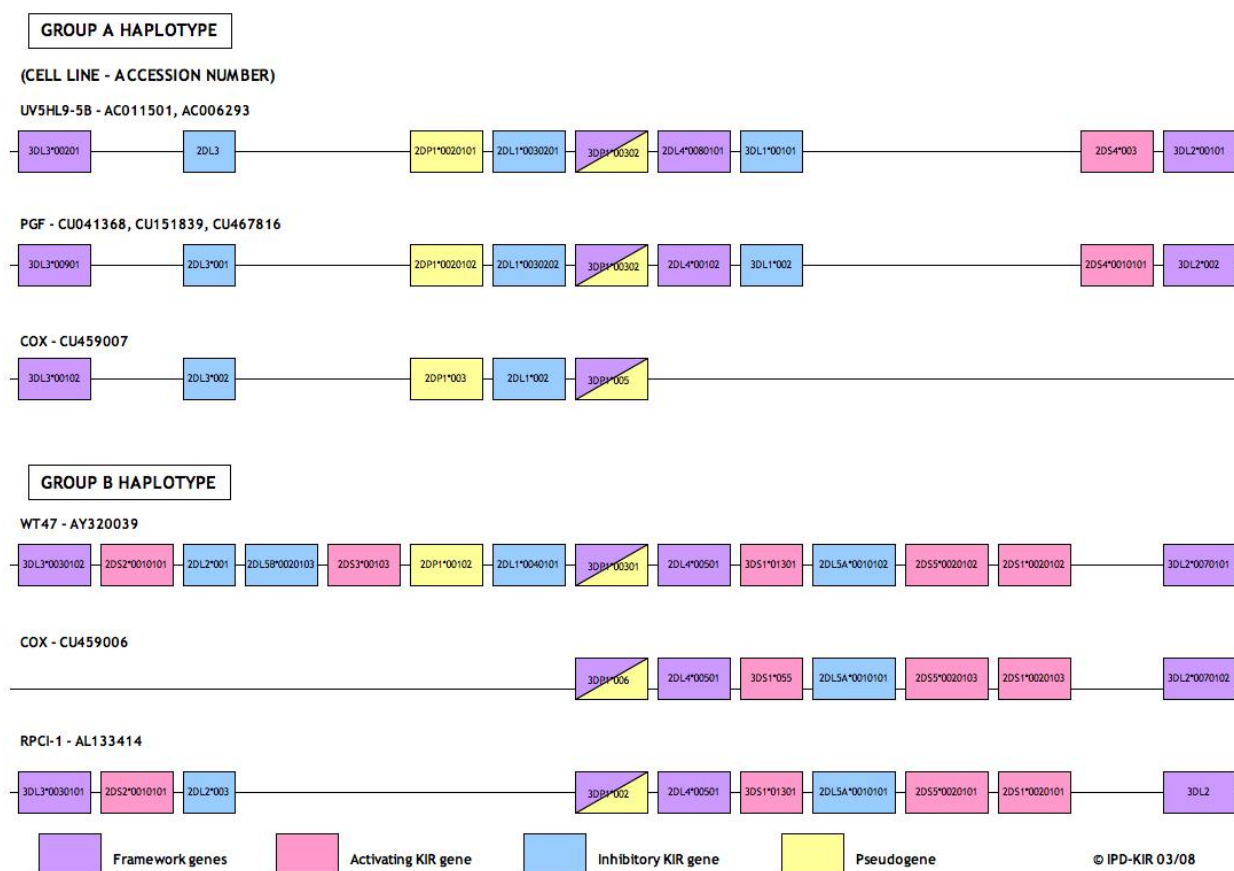


Figura 9: Representação dos dois grupos de haplótipos dos genes *KIR*. Fonte: EBMT

2.11. GENE *KIR2DL4*

O gene *KIR2DL4* é composto por oito exons, sendo que o exon 4, responsável pela codificação do 3º domínio da molécula, encontra-se deletado neste gene. Dessa forma o produto protéico resultante, apresenta 2 domínios (SELVAKUMAR *et al.*, 1996). Essa mesma deleção do exon 4 também é observada no gene *KIR2DL5* (VILCHES *et al.*, 2000). Os dois primeiros exons codificam o peptídeo sinal e os exons 3 e 5 codificam os dois domínios semelhantes à Ig. O domínio de união é codificado pelo exon 6, e o transmembrana pelo exon 7 enquanto os domínios citoplasmáticos são codificados pelos exons 8 e 9 (WILSON *et al.*, 1997). Por outro lado, a região promotora do gene *KIR2DL4*, apresenta elementos reguladores que lhe conferem uma regulação diferenciada dos outros genes *KIR* com os quais apresenta 69% de identidade (TROWSDALE *et al.*, 2001).

O receptor KIR2DL4 apresenta função inibitória conferida pelos motivos ITIMs presentes em sua porção citoplasmática. No entanto, um resíduo de asparagina em seu domínio transmembrana lhe confere uma característica de ativação (RAJAGOPALAN *et al.*, 2001; KIKUCHI-MAKI *et al.*, 2003), uma vez que ocorre uma sinalização dependente do contexto onde se liga aos epítomos presentes no HLA-G, ligante específico deste receptor (PONTE *et al.*, 1999). Este gene somente é expresso em células NK, onde também ocorre alta expressão do receptor CD56 (uNK^{bright}), que se destacam pela produção de citocinas mais do que pela ação efetora de citotoxicidade. No entanto, ao invés da interação com a proteína adaptadora DAP12, como ocorre nos receptores ativadores, no receptor KIR2DL4 essa interação é com a proteína adaptadora FcεRI-γ (RAJAGOPALAN *et al.*, 2001)

2.12. POLIMORFISMOS DO GENE *KIR2DL4*

Gene *KIR2DL4* apresenta 9 transcritos distintos, sendo alguns deles resultantes do processamento alternativo, segundo consulta ao banco de dados Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>, acesso outubro 2015) e 52 variações alélicas, que codificam para 28 proteínas diferentes. Até o presente momento não foram descritos alelos nulos, segundo consulta ao banco de dados EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>, acesso outubro 2015).

Na Tabela IV, pode-se observar as variações descritas na região codificadora do gene *KIR2DL4*, onde os exons mais polimórficos são o exon 4, o 5 e o 9. No exon 7 a primeira base do códon 248 (A) apresenta-se deletada em alguns alelos, o que resulta em uma troca de matriz a partir do exon 8, produzindo uma proteína com a cauda citoplasmática truncada e com perda da região transmembrana, sem expressão do receptor na superfície da membrana da célula NK. Em decorrência dessa variação alélica há uma influência direta deste polimorfismo na expressão dos receptores KIR2DL4, sendo o alelo 9A (com a base deletada) associado a baixos níveis de expressão do receptor na membrana das NK sendo que o alelo 10A (base presente) tem sido associado a níveis normais de expressão do receptor KIR2DL4 na membrana das NK (GOODRIGDE *et al.*, 2003).

Tabela IV: Alelos *KIR2DL4*.

AA Codon	16	22	27	30	32	45	64	66	72	78	109	115	137	146	158	161	174	182	186	206	231	234	2	48	251	257	273	316	317	318	321	326	344	347	348		
	Exon 4										Exon 5									Exon 6	Exon 7				Exon 8			Exon 9									
2DL4*00101	GCT	GGA	CGG	TAT	CGT	GTC	GTG	CCA	TAC	CAC	CCG	ACA	GAA	CCT	GAC	CTG	GGC	GAA	GCG	ACT	TTT	CTT	A	AT	GTA	GCG	CAG	AGA	GCG	TTG	GCC	AGT	CTT	TCT	AAT		
2DL4*0010201	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	
2DL4*0010202	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	
2DL4*0010301	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*0010302	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*0010303	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*0010304	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*0010305	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*0010306	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*0010307	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*0010308	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*00104	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*00105	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	---	--C	---	-	--	---	--A	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	
2DL4*00201	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	---	--G	C--	---	---	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*00202	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	--G	---	---	---	---	--G	C--	---	---	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*003	---	---	---	---	---	---	C--	--T	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	--A	--C	--C	G	--	---	---	---	---	---	--A	--G	---	---	--C	C--		
2DL4*004	---	---	---	---	---	---	C--	---	---	---	---	G--	--G	---	---	---	---	--G	C--	--A	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	--C	C--		
2DL4*00501	---	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	G--	--G	---	---	---	---	--G	C--	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*00601	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	G--	--G	---	---	---	---	--G	C--	--A	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
2DL4*00602	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	G--	--G	---	---	---	---	--G	C--	---	--C	---	-	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
2DL4*007	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	-G-	---	G--	--G	---	---	---	---	--G	C--	---	---	---	.	--	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	***	***	
2DL4*0080101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	--G	---	---	---	---	--G	C--	---	---	---	.	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*0080102	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	--G	---	---	---	---	--G	C--	---	---	---	.	--	---	---	---	---	C--	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*0080103	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	--G	---	---	---	---	--G	C--	---	---	---	.	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*0080104	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	--G	---	---	---	---	--G	C--	---	---	---	.	--	---	---	---	---	---	---	---	---	T--	---	---	---	
2DL4*0080105	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	--G	---	---	---	---	--G	C--	---	---	---	.	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2DL4*0080201	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	---	--G	C--	---	---	---	.	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

Tabela IV: Continuação

2DL4*0080202	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	G--	--	--	--	--	--	--G	C--	--	--	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*0080203	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	G--	--	--	--	--	--	--G	C--	--	--	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*0080204	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	G--	--	--	--	--	--	--G	C--	--	--	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*00901	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	G--	-G	--	--	G--	--	--G	C--	--	--	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*00902	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	G--	--	--	--	G--	--	--G	C--	--	--	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*010	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-T-	G--	-G	-A-	--	--	--	--G	C--	--	--	-C	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*011	--	--	--	-G-	--	--	--	--	--	--	G--	-G	--	--	--	--	--G	C--	--	--	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*01201	--	--	--	-G-	--	--	--	--	--	--	G--	-G	--	--	--	--	--G	C--	--	--	-C	--	.	--	--	--	G--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*01202	--	--	--	-G-	--	--	--	--	--	--	G--	-G	--	--	--	--	--G	C--	--	--	-C	--	.	--	--	--	G--	--	--A	--	--	--	--	
2DL4*013	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-G	--	--	--	--	--G	--	--	--	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*014	A--	--	--	-G-	--	--	--	--	--	--	G--	-G	--	--	--	--	--G	C--	--	--	-C	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*015	--	--	T--	--	--	--	--	--	--	--	--	-G	--	--	--	--	--G	--	--	--	-C	--	.	--	--	--	--	--	--A	--	--	--	--	
2DL4*016	--	--	--	--	--	T--	--	--	--	--	--	-G	--	--	--	--	--G	--	--	--	-C	--	.	--	--	--	--	--	--A	--	--	--	--	
2DL4*017	--	A--	--	--	--	--	--	--	--	--	G--	--	--	--	--	--	--G	C--	--	--	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*018	--	--	--	--	G--	--	--	--	--	--	--	-G	--	--	--	A--	--G	--	--	--	-C	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*019	--	--	--	--	G--	--	--	--	--	--	--	-G	--	--	--	A--	--G	--	--	--	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*020	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	G--	-T-	--	--	--	--	--G	C--	--	--	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*021	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-G	--	A--	--	--	--G	--	--	--	-C	--	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
2DL4*022	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-G	--	--	--	--	--G	--	--	--	-C	--	.	--	--	--	--	T-	--	--	--	--	--	
2DL4*023	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-G	--	--	--	A--	--G	--	--	--	-C	--	.	--	--	--	--	--	--	--	-C-	--	--	
2DL4*024	--	--	--	-G-	--	--	--	--	--	--	G--	-G	--	--	--	--	--G	C--	--	--	-C	--	.	--	--	--	G--	--	--	--	--	-C-	--	--
2DL4*025	--	--	--	-G-	--	--	--	--	--	--	G--	-G	--	--	--	--	--G	C--	--	--	-C	--	.	--	--	--	--	--	--	--	-C-	--	--	
2DL4*026	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-G	--	--	--	--	--G	--	--	--	-C	--	.	--	--	--	G--	--	--	--	--	-C-	--	--
2DL4*027	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-G	--	--	--	--	--G	--	--	--	-C	--	.	--	--C	--	--	--	--	--	--	--	--	

- sequência é idêntica a sequência referência (*HLA-G*01:01:01*); * sequência não foi sequenciada até o momento; . base deletada

2.13. DIVERSIDADE POPULACIONAL DE *KIR2DL4*

Este gene, pelo fato de ter sido selecionado evolutivamente como um gene de moldura na composição do repertório dos genes *KIR*, apresenta uma frequência populacional de praticamente 100%, conforme revisado por Tajik *et al.*, em 2009, sendo que apenas na população paquistanesa de Karachi, foi observada uma frequência de 99% entre os 78 indivíduos da amostra. Estudos na população chinesa Han (JIANG *et al.*, 2005), México (CONTRERAS *et al.*, 2007), Líbano e Palestina (RAYES *et al.*, 2007), Polinésia (VELICKOVIC *et al.*, 2006), Venezuela (GENDZEKHADE *et al.*, 2006), sul da Índia (RAJALINGAM *et al.*, 2008), Brasil (Amazônia) (EWERTON *et al.*, 2007), Indonésia (Java, Kalimantan, Timor e Irian Jaya) (VELICKOVIC *et al.*, 2008) apresentam 100% de presença do gene *KIR2DL4*. O mesmo foi observado em populações do Irã, Líbano, Palestina, Austrália, Omã, Índia, Turquia, Itália, Inglaterra, Estados Unidos, caucasóides, Argentinos, Coreanos, oeste da África, Japão, China, onde a frequência de *KIR2DL4* ocorreu dentro dos 100% esperado.

Na população de Zhejiang Hano o perfil da frequência alélica de *KIR2DL4* foi semelhante ao da população de Hong Kong estudada por Williams *et al.*, em 2004, onde o alelo *KIR2DL4*00102* foi o mais frequente com frequência de 0,52, sendo o menos frequente a variante alélica *KIR2DL4*00202* com 0,019. Na população chinesa o alelo *KIR2DL4*00202* entre outros alelos apresentou-se ausentes na população; o polimorfismo de deleção da cauda poli (A) no exon 7 foi de 0,176 nesta mesma população chinesa (ZHU *et al.*, 2006).

Williams *et al.*, em 2004, observaram uma maior frequência do genótipo *KIR2DL4*00102/KIR2DL4*00103* nas populações de Hong Kong, Omã, Xhosa (África do Sul) e mulatos de Cuba, com as frequências de 0,563, 0,388, 0,520, 0,393, respectivamente, sendo na população da Irlanda do Norte o mais frequente *KIR2DL4*005/KIR2DL4*011*, com frequência de 0,327. Os alelos menos frequentes nessas populações foram, em Hong Kong e Omã o alelo *KIR2DL4*00201/KIR2DL4*00802* que mostrou-se ausente entre os indivíduos da amostra e frequência de 0,100, respectivamente, na população da Xhosa, em mulatos de Cuba e na Irlanda do Norte *KIR2DL4*00202/KIR2DL4*00801/KIR2DL4*009* com frequências de 0,020, 0,119 e 0,157, respectivamente.

Em estudo sobre frequências alélicas de *KIR2DL4* na população eurodescendentes e ameríndia (Chiriguano e Wichis) da Argentina foi observado que o alelo *KIR2DL4*005* era o mais frequente entre os eurodescendentes (0,335) e o segundo mais frequente em ameríndios (0,456 nos Chiriguano e 0,412 nos Wichis). O alelo *KIR2DL4*00102*, apresentou a maior frequência (> 0,520) em ambas populações; o menos frequente nos caucasóides foi *KIR2DL4*006* com frequência de 0,045, que se mostrou ausente nos ameríndios, assim como *KIR2DL4*00201* na Wichis, sendo esse muito raro na população Chiriguano (0,020); o alelo *KIR2DL4*00202* também é pouco frequente em ameríndios (0,039 em Chiriguano e 0,022 em Wichis) já em caucasóides é mais frequente (0,159) (FLORES *et al.*, 2007). A população da Irlanda do Norte (MIDDLETON *et al.*, 2005) tem um perfil de frequência alélica semelhante à população caucasóide argentina descrita por Flores e colaboradores, em 2007. A população ameríndia da Argentina tem uma maior semelhança a populações da China, Hong Kong e Xhosa (WILLIAMS *et al.*, 2004).

2.14. GENE *KIR2DL4* E REPRODUÇÃO

Na tabela V estão relacionadas informações obtidas de poucos estudos onde se investigou o gene *KIR2DL4* com algumas patologias, como abortamento espontâneo recorrente (AER) (WITT *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2007; VARGAS, 2009) e pré-eclampsia (LI *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2009).

Tabela V: Estudos que investigaram *KIR2DL4* e sua associação com patologias.

Autores	População	Patologia ou condição associada	Associação
Witt <i>et al.</i> , 2004	Austrália	AER ¹	NS ²
Yan <i>et al.</i> , 2007	China	AER	Alelos 9A são mais frequentes em mulheres com AER
Li <i>et al.</i> , 2008	China	PE ³	Expressão diminuída de <i>KIR2DL4</i> pode estar associado com o desenvolvimento de PE.
Tan <i>et al.</i> , 2009	Singapura	PE	<i>HLA-G*0106</i> com <i>KIR2DL4*006</i> aumenta risco de PE.
Vargas, 2009	Brasil	ERA	NS
Nowak <i>et al.</i> , 2011	Polônia	Fertilidade	Mulheres sem genótipo de <i>KIR2DL4</i> tiveram sucesso reprodutivo

¹ AER – Aborto espontâneo recorrente; ²NS – Não significativo; ³ PE – Pré-eclampsia

Pode-se observar que *KIR2DL4* tem sido associado a alterações e patologias relacionadas à reprodução, o que poderia ser atribuído a sua interação com seu ligante, HLA-G, durante o curso gestacional.

A relação com patologias relacionadas ao sistema imunológico fundamenta-se, provavelmente, na função de inibição e ativação da atividade das células NK, células com função de controle das infecções virais e alterações neoplásicas, sendo as células alteradas possíveis secretoras de moléculas HLA-G que interagindo com os receptores inibidores das células NK impediriam a correta resposta imunológica.

3. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de 2 artigos, conforme norma da formatação do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR, sendo o Capítulo I referente ao artigo já aceito e publicado.

CAPÍTULO I

Human Immunology 77 (2016) 1179–1186



Contents lists available at ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

HLA-G profile of infertile couples who underwent assisted reproduction treatment



Cynthia Hernandez Costa M.D.^a, Georgia Fernanda Gelmini M.D.^a, Fabiola Silva Nardi M.D.^a,
Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo Ph.D.^a, Alessandro Schuffner, Dr.^b, Maria da Graça Bicalho Ph.D.^{a,*}

^aImmunogenetic and Histocompatibility Laboratory, Genetic Department, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba (PR), Brazil

^bConceber, Medical Center of Reproduction, Curitiba (PR), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2015

Revised 29 July 2016

Accepted 6 September 2016

Available online 8 September 2016

Keywords:

HLA-G regulatory region

HLA-G coding region

Human reproduction

Protective haplotype

Susceptibility haplotype

ABSTRACT

HLA-G codes for a non-classical class I (Ib) protein which is mainly expressed in trophoblast cells. Many pieces of evidence pointed out its essential role conferring immunological tolerance to the fetus. Some HLA-G alleles have been linked to enhanced or reduced HLA-G protein levels expression, which have been associated with reproductive failure. In this study 33 couples undergoing ART (assisted reproduction treatment; n = 66) and 120 couples who conceived naturally (controls; n = 240) were enrolled in the study. Genotyping was performed by SBT and tagged an 1837 bp at 5'UTR as well as exons 2, 3 and 4 of HLA-G. Alleles, genotypes and haplotypes were compared between infertile and control groups using Fisher Exact Test. The haplotype HLA-G*010101b/HLA-G*01:01:01 showed statistically significant higher frequency in control groups. The immunogenetics of infertility is complex and might be dependent on different genes involved in the establishment of a successful pregnancy. A better understanding of HLA-G alleles and haplotypes structure and how the genetic diversity at their regulatory sites could impact on their level of expression and build up the susceptibility or protection conditions may shed light on the comprehension of immunogenetics mechanisms acting at the fetus-maternal interface.

© 2016 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

***HLA-G* profile of infertile couples who underwent assisted reproduction treatment**

Cynthia Hernandez Costa M.D.^a; Georgia Fernanda Gelmini M.D. ^a; Fabiola Silva Nardi M.D. ^a; Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo Ph.D.^a; Alessandro Schuffner Dr^b; Maria da Graça Bicalho Ph.D.^{a*}

^a Immunogenetic and Histocompatibility Lab, Genetic Department, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba (PR), Brazil.

^b Conceber, Medical Center of Reproduction, Curitiba (PR), Brazil.

*Correspondence to Prof. Maria da Graça Bicalho, Ph.D.

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade,
Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná
R. Cel. Francisco H. dos Santos S/N
Centro Politécnico – Jardim das Américas
CP 19071, CEP 81.530.990, Curitiba –PR, Brazil
Tel: +55 41 3361 1729, Fax: +55 41 3266 2042
e-mail: ligh@ufpr.br

ABSTRACT

HLA-G codes for a non-classical class I (Ib) protein which is mainly expressed in trophoblast cells. Many pieces of evidence pointed out its essential role conferring immunological tolerance to the fetus. Some HLA-G alleles have been linked to enhanced or reduced HLA-G protein levels expression, which have been associated with reproductive failure. In this study

33 couples undergoing ART (assisted reproduction treatment; n = 66) and 120 couples who conceived naturally (controls; n = 240) were enrolled in the study. Genotyping was performed by SBT and tagged an 1837 bp at 50 URR as well as exons 2, 3 and 4 of *HLA-G*. Alleles, genotypes and haplotypes were compared between infertile and control groups using Fisher Exact Test. The haplotype *HLA-G* 010101b/HLA-G*01:01:01* showed statistically significant higher frequency in control groups. The immunogenetics of infertility is complex and might be dependent on different genes involved in the establishment of a successful pregnancy. A better understanding of *HLA-G* alleles and haplotypes structure and how the genetic diversity at their regulatory sites could impact on their level of expression and build up the susceptibility or protection conditions may shed light on the comprehension of immunogenetics mechanisms acting at the fetus-maternal interface.

KEYWORDS

HLA-G regulatory region; HLA-G coding region; human reproduction; protective haplotype; susceptibility haplotype

1. Introduction

Infertility may be due to a combination of factors, genetics and non genetics, which equally can be traced to the woman, the man or both and that renders 15% of couples unable to get pregnant [1]. Amongst genetics factors, the immunogenetic of reproduction has been intensively investigated and evidences have been pointed out that it may influence the outcome of human pregnancy. The improvement of molecular methods provided researchers with valuable tools to examine how genes encoding immunological factors associated with regulatory mechanisms controlling genes expression affect reproduction [2].

Polymorphic immune genes are located on the short arm of chromosome 6, 6p21.3, in a region nominated Major Histocompatibility Complex (MHC) [3]. Cloned by Geraghty et al., in 1987 [4], the *HLA-G* gene presents similar organization as to classical HLA class I genes, with eight exons, seven introns and 3'UTR. Nucleotide variations described in the coding region of HLA-G result in 50 alleles, 16 proteins and 2 null alleles according to IMGT/HLA database [5].

The alternative splicing of HLA-G transcript results in four isoforms membrane-bound (HLA-G1, G2, G3 and G4). The maintenance of the introns 2–4 during the processing of mRNA produces three soluble isoforms (HLA-G5, G6 and G7) [6,7].

HLA-G presence at extravillous trophoblast was suggested by some authors [4,8] but it was only in the 1990s that its classification as non-classical class I gene and its importance in human placenta were reported [9,10].

HLA-G is also expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues obtained from different individuals (peripheral blood leukocytes, placenta, skin, spleen, thymus, prostate, testicle, ovary, small intestine, colon, heart, brain, lung, liver, and kidney), as well as in fetal tissues (heart, lung, liver, and kidney) [11].

The promoter region of the *HLA-G* gene is not conserved as in classical class I genes, which may impact in the binding and affinity of transcriptional factors and their subunits which usually active MHC class I genes expression [4,12–14]. The lack or the differential expression of HLA-G in trophoblast cells could be associated with differences in promoter regulatory sequences which could be taken to imply a unique regulation of HLA-G transcription among the MHC class Ib genes [15].

HLA-G analysis of inferred haplotypes which combined polymorphisms positioned at regulatory regions of *HLA-G* gene provided evidence for possible mechanism

involved in the maintenance of pregnancy. It was observed that nucleotide differences may be linked to altered patterns of HLA-G mRNA and protein levels of expression [16,17].

The present study was carried out to investigate the genetic diversity of *HLA-G* gene. Specifically, genotypes and inferred haplotypes related to 31 SNPs (Fig. 1) located at 5' UTR and polymorphisms located at the coding region of *HLA-G* and their influence on infertility condition and outcome after assisted reproductive treatment (ART) on women with successful and non-successful pregnancy.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

The patient group was composed of 33 Brazilian infertile couples (n = 66) who underwent assisted reproduction treatment (IVF-In Vitro fertilization) at “Conceber” – Medical Center of Reproduction, located in Curitiba, the capital of Parana state, Southern Brazil, between October 2009 and March 2014. They were all invited to participate in a research study whose primary goal was to investigate the *HLA-G* diversity associated with difficulties in natural conception and the success or failure related to ART, meaning, by success, live-births. The exclusion criterion comprised: female age >35 years; endometriosis; decreased ovarian function; ovarian volume smaller than 3 cm³ ; obstructive azoospermia; lower response to treatment with stimulation producing less than 12 antral follicles or 3 eggs and hormone levels of FSH and estradiol superior to 10 IU and 80 pg, respectively and considered minimum levels according to the guidelines of the American Society for Reproductive Medicine.

One hundred and twenty control couples (n = 240), who conceived naturally, plus 35 pregnant women, unrelated to the patients, with two or more children and without a history of idiopathic miscarriages or other reproductive problems were invited to take part of

the study. The mean age of controls was 44.2 ± 11.6 for women and 46.8 ± 12.3 for men. The average age of the fertile women in their first pregnancy was 24.5 ± 4.33 years. Patient and control couples who agreed to enroll in signed an informed consent of voluntary participation and filled a personal and occupational questionnaire. Blood samples and genotyping from all participants were carried out between March 2010 and August 2011 at the Laboratory of Immunogenetics and Histocompatibility (LIGH) of the Genetics Department, Federal University of Paraná UFPR (Brazil). The patients and control couples were matched according to ethnic, social and economic status. The Ethics Committee of the Hospital de Clínicas of the UFPR (HC-UFPR) approved the study (CEP-HC N° 037ext.019/2001-07).

2.2. *HLA-G Genotyping*

DNA extraction from PBCs was performed according to Lahiri e Nurnberger (1991) [18] protocol. PCR reactions were carried out using Taq 1X buffer (70 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0.45 mM of each dNTP, 2 mM MgCl₂, 2 U *Taq* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 pM or 20 pM of each specific primer pair and 50 ng/IL of DNA.

Thirty-one SNPs along the 1400 bp upstream the transcriptional start site of *HLA-G*, all previously identified were genotyped. Amplification of the 1837 bp at 5' URR of the *HLA-G* was performed using three pairs of primers as follow: a) forward ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATG, reverse GTGTGCCTTTGAATCCCGATGC; (b) forward CTGTGAGGTGAATAAAGTTTGTGC, reverse TGTGACTCTGTCTTGCAACCG [19], and; (c) forward TCTTCTAGAAGAGTA, reverse GTTTCCTCCTGACCCCGCACT, resulting in 638 bp, 637 bp and 562 bp PCR products, respectively. A total of 31 SNPs were genotyped (Fig. 1).

Amplification of exons 2, 3 and 4 was performed using the following pairs of primers: EXON 2 forward GGGTCGGGCGGGTCTCAA, reverse TCCGTGGGGCATGGAGGT; EXON 3 forward CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG, reverse CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA; and EXON 4 forward CCATGAGAGATGCAAAGTGCT, reverse TGCTTTCCTAACAGACATGAT [20], resulting in 588 bp, 456 bp and 364 bp PCR products, respectively.

The initial denaturation cycle was carried out at 96°C for 5 min; followed by 35 cycles at 96°C for 1 min, 66°C (5'URR, 2 and 4 exon) or 68°C (exon 3) for 30 s and 72°C for 1 min; and a final extension step at 72°C for 5 min. The resulting amplicon was purified with 10 U of Exonuclease I and 1 U Shrimp Alkaline Phosphatase (USB Corporation, Staufen, Germany) to remove excess of primers and dNTPs, followed by a sequencing reaction with ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, CA, USA). Sequencing products were eluted by electrophoresis using an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). The primers used in the direct DNA sequencing were the same as the PCR amplification. All sequences obtained were aligned using SeqScape Software 2.5 version (Applied Biosystems, CA, USA) and compared to FASTA sequence obtained from Ensemble. After that each SNP detected was individually noted.

2.3. Statistical Analysis

Allelic and genotypic frequencies were determined by direct counting considering HLA-G 5'URR and coding regions alleles separately and together (haplotypes). Alleles that resulted from a particular combination of SNPs at 5'URR were referred as “promoter alleles” according to Larsen and Hviid, 2009 [21]. Alleles with frequencies less than 0,01 (1%) were not considered for comparisons.

To assess the agreement between genotypes observed and those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium as well as comparisons between groups, the χ^2 or Fisher exact were performed using the GENEPOP version 4.0.10 with significance set at $p \leq 0.05$. Odds ratio (OR) were calculated using BIOESTAT 5.0 with 95% confidence intervals (CI) to assess patients' increased risk of infertility in comparison with controls.

Where appropriate (promoter alleles and haplotypes) to avoid type I errors (false positive results) a Bonferroni correction was applied [22].

Estimation of the haplotype frequencies was performed with ARLEQUIN version 3.11. The expectation-maximization (EM) algorithm was used to determine the SNPs haplotype frequencies in the 5'URR and alleles of *HLA-G* (1000 bootstrap replicates) cut-off = 0.01 [23].

3. Results

3.1. Characterization of ART patients

The analysis of the clinical data of ART women showed an average age of 31.3 years (± 31.2), against 34.60 years (± 4.83) for ART men. No consanguineous marriage was observed among patient couples. Chronic diseases or diseases associated with infertility were also ruled out.

The average length of time from marriage to the date of interview was 9 years (± 3.19). Nineteen out 44 couples reported no previous attempts before conceiving while for the remaining couples the number of attempts was 1.65 times (± 2.00) with an average number of abortions 0.36 (± 0.89). Among 33 couples 9 underwent ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) and 24 couples underwent IVF (In Vitro Fertilization) treatment. The parameters related to the prediction of a successful treatment of infertility such as hormonal status, recruited follicles/ovules and good quality embryos, were as follow: hormonal dosage

of FSH [ICSI 5.98 (± 2.59); IVF 5.98 (± 1.94)]; estradiol [ICSI 59.38 (± 17.34); IVF 51.56 (± 17.90)], antral follicle [ICSI 11 (± 4.69) IVF 10.38 (± 5.35)], ovules 9.9 (± 5.17), 3.7 (± 2.31) total obtained embryos, 2.00 (± 0.44) transferred embryos. As to quality of obtained embryos the parameters according to the American Society for Reproductive Medicine were as follow, n (%): A 2 (10), B 17 (85), C 1 (5) and D 0(0).

The clinical data of the study group after stratification according to a successful outcome (n = 16) vs. failure (n = 17) were: 30.76 years (± 2.21) was the average age of women with successful outcome and 31.9 (± 2.33) for those with failure. The average number of previous attempts before conceiving among successful women was 1.66 (± 2.15), while among failure it was 1.65 (± 1.87). Both groups showed good quality of the embryos analyzed, averaging antral follicle of 12.00 (± 6.16) and 9.46 (± 3.66), number of eggs of 10.93 (± 4.52) and 9.00 (± 6.63) and number of embryos of 4.66 (± 2.84) and 2.69 (± 1.43) for women with success and failure, respectively. After stimulation, the hormone levels for the groups successfully and unsuccessfully treated were: FSH 6.45 (± 1.95) and 5.53 (± 2.5), and estradiol 50.95 (± 17.86) and 52.01 (± 17.83), respectively.

3.2. *HLA-G 5'URR: alleles and genotypes diversity*

Thirty-one SNP positions, comprising eleven promoter haplotypes are shown in Fig. 1 with allele nominations according to Larsen and Hviid (2009) [21]. Promoter alleles *HLA-G*010101a*, *HLA-G*010101b*, *HLA-G*010101c* and *HLA-G*010101e* are in bold type to contrast SNPs differences among them.

HLA-G promoter allele frequencies comparisons between infertile vs. control group couples and groups stratified by gender are displayed in Table 1, Supplementary Tables 1 and 2. It was observed that the promoter allele *HLA-G*010101b* showed the higher frequency in infertile group couples ($p_c = 0.22$; $p = 0.02$; OR = 2.85; CI = 1.17–6.92). It was also the more prevalent allele in infertile men group ($p_c = 0.22$; $p = 0.02$; OR = 3.9; CI =

1.21–12.52) when comparisons were stratified and performed by gender (Supplementary Table 2).

The promoter genotypes *HLA-G*010102a/HLA-G*010101e* ($pc = 0.76$; $p = 0.02$; OR = 3.44; CI = 1.19–9.87), *HLA-G*010101b/HLA-G*010101a* ($pc = 0.76$; $p = 0.02$; OR = 7.67; CI = 1.27–42.88) and *HLA-G*010101b/HLA-G*0104a* ($pc = 1.0$; $p = 0.03$; OR = 11.38; CI = 1.16–111.28) were more common among infertile couples (Table 2). Comparisons between groups stratified by gender showed higher frequency of *HLA-G*010101b/HLA-G*0104a* genotype in infertile men group ($pc = 1.0$; $p = 0.03$; OR = 11.90; CI = 1.18–118.5) (Supplementary Tables 3 and 4).

Allele comparisons, showed in Table 3, Supplementary Tables 5 and 6, were performed between ART couples, ART women and ART men with successful or unsuccessful outcome after assisted reproductive treatment (ART). The promoter allele *HLA-G*0104a* ($pc = 0.44$; $p = 0.04$; OR = 0.35; CI = 0.12–1.07) was more frequently observed among ART couples unsuccessfully treated, and also the more prevalent allele in ART women unsuccessfully treated ($pc = 0.55$; $p = 0.05$; OR = 0.21; CI = 0.04–1.11). However, after Bonferroni correction, no statistically significant differences persisted.

3.3. *HLA-G allelic and genotype diversity*

The allele *HLA-G*01:03* was significantly higher in control couples ($pc = 0.45$; $p = 0.05$; OR = 0.44; CI = 0.17–1.15) (Table 1), nonetheless after Bonferroni correction this difference became statistically no significant. No significant differences in allele distributions were observed when comparisons were performed between groups stratified by gender (Supplementary Tables 1 and 2). No significant differences were found in the comparisons of *HLA-G* genotype frequencies (Table 2, Supplementary Tables 3 and 4).

Allele comparisons were performed between couples and groups stratified by gender with successful or unsuccessful outcome after assisted reproductive treatment (ART) and no significant differences were observed (Table 3, Supplementary Tables 5 and 6).

3.4. Haplotypes: infertility and ART outcomes

Haplotypes obtained by combining 5'URR and coding *HLA-G* alleles were compared between infertile and control groups and groups stratified by gender (Table 4). Comparisons were also performed between ART couples and ART groups stratified by gender who were successful or unsuccessful after treatment (Table 5).

The haplotype *HLA-G*010101b/HLA-G*01:01:01* was more frequent in infertile couples ($pc = 0.41$; $p = 0.032$; OR = 2.75; CI = 1.08–6.98) and also in infertile men when compared to control men ($pc = 0.26$; $p = 0.02$; OR = 4.70; CI = 1.38–15.92). None of them remained statistically significant after Bonferroni correction.

The haplotype *HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01* was more frequently observed in control individuals both when comparisons were performed considering couples ($pc = 0.026$; $p = 0.002$; OR = 0.45; CI = 0.26–0.78) as well as stratified samples by gender (control women: $pc = 0.24$; $p = 0.019$; OR = 0.42; CI = 0.19–0.93; control men: $pc = 0.39$; $p = 0.03$; OR = 0.49; CI = 0.23–1.02). Only the haplotype comparison between controls *vs.* ART couples remained statistically significant after Bonferroni correction.

4. Discussion

The important role of HLA-G protein at maternal-fetal interface and its impact on reproductive success have been reported in several studies [17,24–32].

Difficulties in natural conception and failure related to assisted reproduction treatment (ART) led researchers to investigate possible genetic association. In the present study, the HLA-G profile of couples with no apparent known cause for infertility and who underwent assisted reproduction treatment was evaluated.

Several SNPs have been described at 5'URR and 3'UTR regions of HLA-G which have been associated with its regulation and levels of expression [33]. In the same direction, sHLA-G serum levels have been associated with certain *HLA-G* alleles. Low levels of expression of sHLA-G have been associated with *HLA-G*01:01:03* and *HLA-G*01:05N* alleles, intermediate levels are associated with *HLA-G*01:01:08* and *HLA-G*01:04b* alleles while *HLA-G*01:04:01* and *HLA-G*01:01g* have been nominated as high secretors alleles [34].

As to *HLA-G* 5'URR regulatory profile and its impact on infertility condition, suggestive pieces of evidence were observed in this study to support the concept that the promoter allele *HLA-G*010101b* might be considered a susceptibility allele for infertility predisposition. It's worth mentioning that it was also the most frequent allele in the infertile men group when comparisons were stratified by gender.

In the same line of evidence it was observed that the promoter genotypes *HLA-G*010102a/HLA-G*010101e*, *HLA-G*010101b/HLA-G*010101a* and *HLA-G*010101b/HLA-G*0104a* were more frequently observed among infertile couples while stratified comparisons by gender showed the higher frequency of the *HLA-G*010101b/HLA-G*0104a* genotype in the infertile men group.

In a previous study of our group, Costa et al. 2012 [17] reported that the promoter alleles *HLA-G*010102a* and *HLA-G*010102b* alleles, both associated with

Indel14bp polymorphisms, were significantly more frequent in women submitted to assisted reproduction treatment when compared to control women.

SNPs comparisons (Fig. 1) between the promoter alleles *HLA-G*010101a* (consensus) and *HLA-G*010101b* let us know that they differ at -725 SNP (C/G) which is located within the boundaries of the interferon-sensitive response element (ISRE) at position -744 from the ATG, an important transcriptional site of *HLA-G* [35]. Such SNP difference added to others, not yet resolved, could alter the strength of the bond with transcription factors, impacting upon HLA-G levels and contributing to infertility.

As to the *HLA-G* allelic diversity, the allele *HLA-G*01:03* was more frequently observed in control couples when compared with infertile couples. Interestingly, Nardi et al., 2012 [32], reported that *HLA-G*01:03:01* allele was more frequently observed among couples with implantation failure than in control couples. In the same study, stratified comparisons by gender it was also reported that the *HLA-G*01:04:01* allele was more frequent among women with implantation failure than in control women.

Several studies whose main focus was to assess association between *HLA-G* and pregnancy complications have found a higher risk of recurrent spontaneous abortion associated with the following alleles: *HLA-G*01:04* and *HLA-G*01:05N* alleles [36], *HLA-G*01:01:03* and *HLA-G*01:05N* alleles [37,38], *HLA-G*01:01:03*, *HLA-G*01:01:05*, *HLA-G*01:01:08* and *HLA-G*01:05N* alleles [26] and a tendency of association with the *HLA-G*01:06* allele [39]. Other studies focused on preeclampsia found an increased frequency of *HLA-G*01:06* allele associated with this pregnancy complication [30,40].

Few studies evaluating *HLA-G* and pregnancy complications were carried out in the Brazilian population. Vargas et al., 2011 [41], observed a higher frequency of the allele group *HLA-G*01:01A* that included (*G*01:01:01*; *G*01:01:02*; *G*01:01:03*; *G*01:01:04*;

*G*01:01:05* and *G*01:01:06*) in control women when compared to women with recurrent miscarriage.

Haplotypes comparisons showed a higher frequency of carriers of *HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01* haplotype in control individuals [couples (OR = 0.45; CI = 0.26–0.78); men (OR = 0.49; CI = 0.23– 1.02); women (OR = 0.42; CI = 0.19–0.93)] than in infertile individuals. It is worth mentioning that the haplotype *HLA-G*010101a/ HLA-G*01:01:01* is a combination of a promoter region allele (*HLA-G*010101a*), described as a suggestive infertility protector allele, and the coding region allele associated with high serum levels of sHLA-G [34]. A puzzling finding was that the ART women who presented successful outcome after treatment shared the same haplotype (*HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01*) as control individuals.

Nowadays, it is yet difficult to reach a consensus on the role of different *HLA-G* alleles in the course of pregnancy. Evidences obtained in this study are suggestive that a combination of variants involving the promoter region and the coding region (exon 2, 3 and 4) of *HLA-G* could be essential for determining adequate levels of gene expression and thus the gestational success of the couple. Identifying *HLA-G* regulatory differences among alleles not only may improve our understanding of the biology of the pregnancy, but also may help to unravel the immunogenetics factors associated to infertility. Besides, these molecular factors could, therefore, be a target for further treatments which could help infertile couples, mainly if the research findings would be accurately translates into clinical practice.

5. Conclusion

In conclusion, pregnancy is a multifactorial physiological state, which is influenced by genetic and environmental factors. Genetics conditions can be traced to the various factors not mutually exclusive. The immunogenetics of infertility is complex and might be dependent on different genes involved in the establishment of a successful pregnancy. A better understanding of *HLA-G* allele structure and how the genetic diversity at regulatory sites shared by different alleles and haplotypes (susceptibility *vs.* protection) could impact on its level of expression might shed further light on the comprehension of immunogenetics mechanisms acting at fetus- maternal interface.

Acknowledgements

We are very grateful to the couples who kindly accorded to provide samples for this study. We are also very thankful to Clinical Conceber and LIGH staff for technical support received. This study was supported by the research fund of FUNPAR-LIGH.

References

- [1] M.M. Matzuk, D. Lamb, The biology of infertility: research advances and clinical challenges, *Nat. Med.* 14 (2008) 1197–1213.
- [2] S.R. Chouchury, L.A. Knapp, Human reproductive failure II: Immunogenetics and interactive factors, *Hum. Reprod. Update* 7 (2001) 135–160.
- [3] L.U. Lamm, B. Olaisen, Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 5 and 6, *Cytogenet. Cell Genet.* 40 (1985) 128–155.
- [4] D.E. Geraghty, B.H. Koller, H.T. Orr, A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 9145–9149.

- [5] IMGT/HLA Database, Available at <<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.htm>>, Out. 2015.
- [6] P. Le Bouteiller, A. Blaschitz, The functionality of HLA-G is emerging, *Immunol. Rev.* 167 (1999) 233–244.
- [7] A. Blaschitz, H. Juch, A. Volz, H. Hutter, C. Daxboeck, G. Desoye, G. Dohr, The soluble pool of HLA-G produced by human trophoblasts does not include detectable levels of the intron 4-containing HLA-G5 and HLA-G6 isoforms, *Mol. Hum. Reprod.* 11 (2005) 699–710.
- [8] S.A. Ellis, I.L. Sargent, W.G. Redman, A.J. Mcmichael, Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line, *Immunology* 59 (1986) 595–601.
- [9] S.A. Ellis, M.S. Palmer, A.J. Mcmichael, Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule, *J. Immunol.* 144 (1990) 731–735.
- [10] S. Kovats, E.K. Main, C. Librach, M. Stubblebine, S.J. Fisher, R. Demars, A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblast, *Science* 248 (1990) 220.
- [11] M. Onno, T. Guillaudeux, L. Amiot, I. Renard, B. Drenou, B. Hirel, M. Girr, G. Semana, P. Le Bouteiller, R. Fauchet, The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues, *Hum. Immunol.* 41 (1994) 79–86.
- [12] N. Goes, T. Sims, J. Urmson, D. Vincent, V. Ramassar, P.F. Halloran, Disturbed MHC regulation in the INF- γ knockout mouse. Evidence for three states of MHC expression with distinct roles for INF- γ , *J. Immunol.* 155 (1995) 4559–4566.
- [13] S.J.P. Gobin, V. Keijsers, A.M. Woltman, A. Peijnenburg, L. Wilson, P.J. Van Den Elsen, Locus-specific regulation of HLA class I gene expression, in: D. Charron (Ed.), *Genetic Diversity of HLA, Func. Med. Implic.*, vol. 2, 1997, pp. 295–297.

- [14] R. Rizzo, M. Stignani, L. Melchiorri, O.R. Baricordi, Possible role of human leukocyte antigen-G molecules in human oocyte/embryo scretome, *Hum. Immunol.* 70 (2009) 970–975.
- [15] S.J. Gobin, P.J. Van Den Elsen, Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G, *Hum. Immunol.* 61 (2000) 1102–1107.
- [16] S. Hiby, A. King, A. Sharkey, Y.W. Loke, Molecular studies of trophoblast HLA-G: Polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo, *Tissue Antigens* 53 (1999) 1–13.
- [17] C.H. Costa, G.F. Gelmini, P.F. Wowk, S.B. Mattar, R.G. Vargas, V.M. Roxo, A. Schuffner, M.G. Bicalho, HLA-G regulatory haplotypes and implantation outcome in couples who underwent assisted reproduction treatment, *Hum. Immunol.* 73 (2012) 891–897.
- [18] D.K. Lahiri, J.I. Nurnberger, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acid Res.* 19 (1991) 5444.
- [19] J.S. Silva, Região reguladora, promotora e exon4 de HLA-G em casais com histórico de abortamento recorrente (thesis submitted to the Course Graduate in Biological Sciences), Federal University of Paraná, Brazil, 2009.
- [20] E.C. Castelli, C.T. Mendes-Júnior, E.A. Donadi, HLA-G alleles and HLA-G 14bp polymorphisms in a Brazilian population, *Tissue Antigens* 70 (2007) 62–68.
- [21] M.H. Larsen, T.V. Hviid, Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease, *Hum. Immunol.* 70 (2009) 1026–1034.
- [22] J.M. Bland, D.G. Altman, Multiple significance tests: the Bonferroni method, *BMJ* 310 (1995) 170.
- [23] L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider, Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis, *Evol. Bioinform.* 1 (2005) 47–50.

- [24] J.S. Hunt, L. Jadhav, W. Chu, D.E. Geraghty, C. Ober, Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183 (2000) 682–688.
- [25] T.V. Hviid, S. Hylenius, C. Rorbye, L.G. Nielsen, HLA-G variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels, *Immunogenetics* 55 (2003) 63–79.
- [26] A. Abbas, P. Tripathi, S. Naik, S. Agrawal, Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions, *Eur. J. Immunogenet.* 31 (2004) 275–278.
- [27] T.V. Hviid, R. Rizzo, O.B. Christiansen, L. Melchiorri, A. Lindhard, O.R. Baricordi, HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms, *Immunogenetics* 56 (2004) 135–141.
- [28] I. Nocci, B. Fuzzi, R. Rizzo, L. Melchiorri, L. Criscuoli, S. Dabizzi, R. Biagiotti, S. Pellegrini, A. Menicucci, O.R. Baricordi, Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos, *Hum. Reprod.* 20 (2005) 138–146.
- [29] W.H. Yan, L.A. Fan, J.Q. Yang, L.D. Xu, Y. Ge, F.J. Yao, HLA-G polymorphism in a Chinese Han population with recurrent spontaneous abortion, *Int. J. Immunogenet.* 33 (2006) 55–58.
- [30] C.Y. Tan, J.F.V. Ho, Y.S. Chong, A. Loganath, Y.H. Chan, J. Ravichandran, C.G. Lee, S.S. Chong, Paternal contribution of HLA-G*0106 significantly increases risk for pre-eclampsia in multigravid pregnancies, *Mol. Hum. Reprod.* 14 (2008) 317–324.
- [31] O. Sipak-Szmigiel, C. Cybulski, D. Wokotorczyk, J. Lubinski, R. Kurzawa, T. Baczkowski, M. Radwan, P. Radwan, E. Ronin-Walknowska, HLA-G polymorphism and *in vitro* fertilization failure in a Polish population, *Tissue Antigens* 79 (2009) 348–352.

- [32] F.S. Nardi, R. Slowik, P.F. Wowk, J.S. Silva, G.F. Gelmini, T.F. Michelin, J. Neumann, M.G. Bicalho, Analysis of HLA-G polymorphisms in couples with implantation failure, *Am. J. Reprod. Immunol.* 68 (2012) 507–514.
- [33] T.V.F. Hviid, R. Rizzo, L. Melchiorri, M. Stignani, O.R. Baricordi, Polymorphism in the 5'upstream regulatory and 3'unstrated region of the HLA-G in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression, *Hum. Immunol.* 67 (2006) 53–62.
- [34] V. Rebmann, K. Van Der Ven, M. Pähler, K. Pfeiffer, D. Krebs, H. Grosse-Wilde, Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles, *Tissue Antigens* 57 (2001) 15–21.
- [35] S. Lefebvre, P. Moreau, V. Guiard, E.C. Ibrahim, F. Adrian-Cabestre, C. Menier, J. Dausset, E.D. Carosella, P. Paul, Molecular mechanisms controlling constitutive and IFN-gamma-inducible HLA-G expression in various cell types, *J. Reprod. Immunol.* 43 (1999) 213.
- [36] C.I. Aldrich, M.D. Stephenson, T. Karrison, R.R. Odem, D.W. Branch, J.R. Scott, J. R. Schreiber, C. Ober, HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage, *Mol. Hum. Reprod.* 7 (2001) 1167–1172.
- [37] G. Mueller-Eckhardt, P. Mallmann, J. Neppert, A. Lattermann, A. Melk, O. Heine, R. Pfeiffer, J. Zingsem, N. Domke, A. Mohr-Pennert, Immunogenetic and serological investigations in nonpregnant and in pregnant women with a history of recurrent spontaneous abortions. German RSA/IVIG Study Group, *J. Reprod. Immunol.* 27 (1994) 95–109.
- [38] K.A. Pfeiffer, R. Fimmers, G. Engels, H. Van Der Ven, K. Van Der Ven, The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion, *Mol. Hum. Reprod.* 7 (2001) 373–378.

- [39] T.V. Hviid, S. Hylenius, A.M. Hoegh, C. Kruse, O.B. Christiansen, HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions, *Tissue Antigens* 60 (2002) 122–132.
- [40] P. Moreau, I. Contu, F. Alba, S. Lai, R. Simoes, S. Orrù, C. Carcassi, M. Roger, M. Rabreau, E.D. Carosella, HLA-G gene polymorphism in human placentas: possible association of G*0106 allele with preeclampsia and miscarriage, *Biol. Reprod.* 79 (2008) 459–467.
- [41] R.G. Vargas, P.R. Sarturi, S.B. Mattar, E.P. Bompeixe, J.D. Silva, A. Pirri, M.G. Bicalho, Association of HLA-G alleles and 3'UTR 14-bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples, *Hum. Immunol.* 72 (2011) 479–485.

Promoter Alleles ^a	-1306A/G	-1179G/A	-1155G/A	-1140T/A	-1138A/G	-1121C/T	-990G/A	-964A/G	-922C	-810C/T	-762T/C	-725C/G/T	-716G/T	-689G/A	-666T/G	-646A/G	-633A/G	-699C/T	-540	-533A/-	-509C/G	-486C/A	-483A/G	-477G/C	-443G	-400G/A	-391G/A	-369A/C	-201A/G	-56C/T	+15G/A
<i>HLA-G*010101a</i>	G	A	G	A	A	C	G	G	C	C	C	C	T	A	G	A	G	C	-	A	C	A	A	C	G	G	G	C	G	C	G
<i>HLA-G*010101b</i>	G	A	G	A	A	C	G	G	C	C	C	G	T	A	G	A	G	C	-	A	C	A	A	C	G	G	G	C	G	C	G
<i>HLA-G*010101c</i>	G	A	G	A	A	T	G	G	C	C	C	G	T	A	G	A	G	C	-	A	C	A	A	C	G	G	G	C	G	C	G
<i>HLA-G*010101d</i>	G	A	G	A	A	C	G	G	C	C	C	C	T	A	G	A	G	C	-	A	G	A	G	C	G	G	G	C	G	C	G
<i>HLA-G*010101f</i>	G	A	G	A	A	C	G	G	C	C	C	C	T	A	G	A	G	C	-	-	C	A	A	C	G	G	G	C	G	C	G
<i>HLA-G*010102a</i>	A	G	G	T	A	C	G	A	C	C	T	C	G	G	T	A	A	C	-	A	C	C	A	G	G	G	G	A	A	C	A
<i>HLA-G*0103a</i>	G	G	G	A	G	C	G	G	C	C	C	T	T	A	G	A	G	C	G	A	G	A	A	G	G	A	A	A	G	T	G
<i>HLA-G*0103d</i>	G	G	G	A	G	C	G	G	C	C	C	T	T	A	G	A	G	C	G	A	C	A	A	G	G	G	A	A	G	T	G
<i>HLA-G*0103e</i>	G	G	G	A	G	C	G	G	C	C	C	T	T	A	G	G	G	C	-	A	G	A	A	G	G	A	A	A	G	T	G
<i>HLA-G*0104a</i>	A	G	A	A	A	C	G	A	C	C	T	C	G	G	T	A	A	C	-	A	C	C	A	G	G	G	G	A	A	C	A
<i>HLA-G*0104b</i>	A	G	A	A	A	C	G	A	C	C	T	C	G	G	T	A	A	C	-	A	C	C	A	G	A	G	G	A	A	C	A

^a Castelli, 2011

Fig 1. Promoter alleles and SNPs sequences analyzed in the control e case couples.

Table 1.

Allele frequency of 5'URR and coding region of *HLA-G* gene in ART couples (n=132) and control couples (n=480).

<i>HLA-G</i> 5'URR Promoter Region						<i>HLA-G</i> Coding Region*					
ART Couples		Control Couples		p	OR	ART Couples		Control Couples		p	OR
+	-	+	-		(CI)	+	-	+	-		(CI)
<i>HLA-G*010101a</i>	28	104	131	349	0.09	<i>HLA-G*01:01:01</i>	44	88	186	294	0.14
<i>HLA-G*010101b</i>	9	123	12	463	0.02	<i>HLA-G*01:01:02</i>	28	104	116	364	0.27
<i>HLA-G*010101c</i>	3	129	22	458	0.17	<i>HLA-G*01:01:03</i>	4	128	30	450	0.10
<i>HLA-G*010101d</i>	1	131	7	473	0.45	<i>HLA-G*01:01:08</i>	6	126	13	467	0.17
<i>HLA-G*010101e</i>	11	121	22	458	0.09	<i>HLA-G*01:01:15</i>	2	130	1	479	0.11
<i>HLA-G*010102a</i>	51	81	174	306	0.34	<i>HLA-G*01:03**</i>	5	127	39	441	0.05
<i>HLA-G*0103a</i>	6	126	12	468	0.17	<i>HLA-G*01:04***</i>	18	114	65	415	0.57
<i>HLA-G*0103d</i>	2	130	15	465	0.25	<i>HLA-G*01:05N</i>	1	131	1	479	0.38
<i>HLA-G*0103e</i>	2	130	13	467	0.33	<i>HLA-G*01:06</i>	5	127	21	459	0.49
<i>HLA-G*0104a</i>	18	114	70	410	0.45						
<i>HLA-G*0104b</i>	1	131	2	478	0.39						

+ Presence ; - absence.

* Alleles with frequency lower than 0.01 were disregarded.

** *HLA-G*01:03* – includes alleles *HLA-G*01:03:01* e *G*01:03*.*** *HLA-G*01:04* – includes alleles *HLA-G*01:04:01*, *G*01:04:03*, *G*01:04:04*, *G*01:04:05* e *G*01:04*.

Table 2.

Genotype frequency of 5'URR and coding region of *HLA-G* gene in ART couples (n=66) and control couples (n=240).

HLA-G 5'URR Promoter Region						HLA-G Coding Region*								
		ART Couples		Control Couples		P	OR			ART Couples		Control Couples		p
		+	-	+	-		(CI)			+	-	+	-	
HLA-G*010101a/HLA-G*010101a		2	64	22	218	0.08		HLA-G*01:01:01/HLA-G*01:01:01		9	57	41	199	0.32
HLA-G*010101d/HLA-G*010101a		0	66	2	238	0.61		HLA-G*01:01:02/HLA-G*01:01:01		10	56	38	202	0.53
HLA-G*010101d/HLA-G*010101d		0	66	2	238	0.61		HLA-G*01:01:02/HLA-G*01:01:02		5	61	17	223	0.67
HLA-G*010101e/HLA-G*010101a		0	66	6	234	0.23		HLA-G*01:01:03/HLA-G*01:01:01		1	65	4	236	0.71
HLA-G*010102a/HLA-G*010101a		14	52	39	201	0.23		HLA-G*01:01:03/HLA-G*01:01:02		1	65	10	230	0.27
HLA-G*010102a/HLA-G*010101e		7	59	8	232	0.02	3.44 (1.19-9.87)	HLA-G*01:01:03/HLA-G*01:01:03		0	66	2	238	0.61
HLA-G*010102a/HLA-G*010102a		8	58	38	202	0.3		HLA-G*01:01:08/HLA-G*01:01:01		1	65	6	234	0.53
HLA-G*0104a/HLA-G*010101a		5	61	19	221	0.58		HLA-G*01:01:08/HLA-G*01:01:02		0	66	1	239	0.78
HLA-G*0104a/HLA-G*010101e		1	65	5	235	0.62		HLA-G*01:01:08/HLA-G*01:01:08		1	65	1	239	0.39
HLA-G*0104a/HLA-G*010102a		8	58	24	216	0.42		HLA-G*01:01:15/HLA-G*01:01:08		1	65	0	240	0.22
HLA-G*0104a/HLA-G*0104a		0	66	4	236	0.38		HLA-G*01:03**/HLA-G*01:01:01		2	64	17	223	0.18
HLA-G*0104b/HLA-G*010102a		0	66	2	238	0.61		HLA-G*01:03/HLA-G*01:01:02		1	65	10	230	0.27
HLA-G*010101b/HLA-G*010101a		4	62	2	238	0.02	7.67 (1.27-42.88)	HLA-G*01:03/HLA-G*01:01:03		0	66	3	237	0.48
HLA-G*010101b/HLA-G*010102a		2	64	6	234	0.45		HLA-G*01:03/HLA-G*01:01:08		0	66	1	239	0.78
HLA-G*010101b/HLA-G*0104a		3	63	1	239	0.03	11.38 (1.16-111.28)	HLA-G*01:04***/HLA-G*01:01:01		6	60	26	214	0.44
HLA-G*010101c/HLA-G*010101a		0	66	7	233	0.18		HLA-G*01:04/HLA-G*01:01:02		6	60	16	224	0.42
HLA-G*010101c/HLA-G*010101d		0	66	1	239	0.78		HLA-G*01:04/HLA-G*01:01:03		2	64	6	234	0.45
HLA-G*010101c/HLA-G*010101e		1	65	1	239	0.39		HLA-G*01:04/HLA-G*01:01:08		1	65	1	239	0.39
HLA-G*010101c/HLA-G*010102a		1	65	6	234	0.53		HLA-G*01:04/HLA-G*01:01:15		0	66	1	239	0.78
HLA-G*010101c/HLA-G*0104a		0	66	3	237	0.48		HLA-G*01:04/HLA-G*01:03		1	65	7	233	0.46
HLA-G*010101c/HLA-G*010101b		0	66	1	239	0.78		HLA-G*01:04/HLA-G*01:04		0	66	2	238	0.61
HLA-G*010101c/HLA-G*010101c		0	66	1	239	0.78		HLA-G*01:05N/HLA-G*01:01:01		1	65	0	240	0.23
HLA-G*0103a/HLA-G*010101a		0	66	2	238	0.61		HLA-G*01:05N/HLA-G*01:01:02		0	66	1	239	0.78
HLA-G*0103a/HLA-G*010101d		1	65	0	240	0.22		HLA-G*01:06/HLA-G*01:01:01		3	63	8	232	0.51
HLA-G*0103a/HLA-G*010101e		1	65	1	239	0.39		HLA-G*01:06/HLA-G*01:01:02		0	66	5	235	0.29
HLA-G*0103a/HLA-G*010102a		2	64	5	235	0.47		HLA-G*01:06/HLA-G*01:01:03		0	66	2	238	0.61
HLA-G*0103a/HLA-G*0104a		1	65	3	237	0.8		HLA-G*01:06/HLA-G*01:01:08		1	65	0	240	0.22
HLA-G*0103a/HLA-G*0104b		1	65	0	240	0.22		HLA-G*01:06/HLA-G*01:03		1	65	0	240	0.22
HLA-G*0103a/HLA-G*010101b		0	66	1	239	0.78		HLA-G*01:06/HLA-G*01:04		0	66	3	237	0.48

Table 2. Continuation

<i>HLA-G*0103d/HLA-G*010101a</i>	1	65	6	234	0.53	<i>HLA-G*01:06/HLA-G*01:06</i>	0	66	1	239	0.78
<i>HLA-G*0103d/HLA-G*010101e</i>	1	65	1	239	0.39						
<i>HLA-G*0103d/HLA-G*010102a</i>	0	66	3	237	0.48						
<i>HLA-G*0103d/HLA-G*0104a</i>	0	66	4	236	0.38						
<i>HLA-G*0103d/HLA-G*010101c</i>	0	66	1	239	0.78						
<i>HLA-G*0103e/HLA-G*010101a</i>	0	66	4	236	0.38						
<i>HLA-G*0103e/HLA-G*010102a</i>	1	65	5	235	0.62						
<i>HLA-G*0103e/HLA-G*0104a</i>	0	66	3	237	0.48						
<i>HLA-G*0103e/HLA-G*010101b</i>	0	66	1	239	0.78						
<i>HLA-G*0103e/HLA-G*010101c</i>	1	65	0	240	0.22						

+ Presence ; - absence.

* Alleles with frequency lower than 0.01 were disregarded.

** *HLA-G*01:03* – includes alleles *HLA-G*01:03:01* e *G*01:03*.*** *HLA-G*01:04* – includes alleles *HLA-G*01:04:01*, *G*01:04:03*, *G*01:04:04*, *G*01:04:05* e *G*01:04*.

Table3.

Allele frequency of 5'URR and coding region of *HLA-G* gene in ART couples successfully (n=64) and ART couples unsuccessfully (n=68) treated.

<i>HLA-G</i> 5'URR Promoter Region						<i>HLA-G</i> Coding Region*						
	ART Successful		ART Unsuccessful		p	OR		ART Successful		ART Unsuccessful		p
	+	-	+	-		(CI)		+	-	+	-	
<i>HLA-G*010101a</i>	13	51	15	53	0.48		<i>HLA-G*01:01:01</i>	20	44	19	49	0.41
<i>HLA-G*010101b</i>	4	60	5	63	0.53		<i>HLA-G*01:01:02</i>	14	50	14	54	0.51
<i>HLA-G*010101c</i>	3	61	0	68	0.11		<i>HLA-G*01:01:03</i>	1	63	3	65	0.33
<i>HLA-G*010101d</i>	0	64	1	67	0.51		<i>HLA-G*01:01:08</i>	4	60	2	66	0.31
<i>HLA-G*010101e</i>	6	58	5	63	0.45		<i>HLA-G*01:01:15</i>	0	64	1	67	0.51
<i>HLA-G*010102a</i>	28	36	23	45	0.16		<i>HLA-G*01:03**</i>	3	61	2	66	0.47
<i>HLA-G*0103a</i>	2	62	4	64	0.36		<i>HLA-G*01:04***</i>	6	58	11	57	0.18
<i>HLA-G*0103d</i>	2	62	0	68	0.23		<i>HLA-G*01:05N</i>	1	63	0	68	0.48
<i>HLA-G*0103e</i>	1	63	1	67	0.73		<i>HLA-G*01:06</i>	3	61	2	66	0.47
<i>HLA-G*0104a</i>	5	59	13	55	0.04	0.35 (0.12-1.07)						
<i>HLA-G*0104b</i>	0	64	1	67	0.51							

+ Presence ; - absence.

* Alleles with frequency lower than 0.01 were disregarded.

** *HLA-G*01:03* – includes alleles *HLA-G*01:03:01* e *G*01:03*.

*** *HLA-G*01:04* – includes alleles *HLA-G*01:04:01*, *G*01:04:03*, *G*01:04:04*, *G*01:04:05* e *G*01:04*.

Table 4.

Genotype frequency of 5'URR and coding region of *HLA-G* gene in ART couples (n=66) and control couples (n=240).

HLA-G Haplotypes*	ART Couples		Control Couples		P	OR (CI)	ART Women		Control Women		p	OR (CI)	ART Couples		Control Couples		p	OR (CI)
	+	-	+	-			+	-	+	-			+	-				
HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01	18	114	123	357	0.002	0.45 (0.26-0.78)	8	58	59	181	0.019	0.42 (0.19-0.93)	10	56	64	176	0.03	0.49 (0.23-1.02)
HLA-G*0103d/HLA-G*01:03**	1	131	14	466	0.131		0	66	7	233	0.179		1	65	7	233	0.46	
HLA-G*0103e/HLA-G*01:03	1	131	12	468	0.191		1	65	5	235	0.617		0	66	7	233	0.18	
HLA-G*010101d/HLA-G*01:01:01	1	131	7	473	0.457		0	66	3	237	0.481		1	65	4	236	0.71	
HLA-G*010101e/HLA-G*01:01:01	7	125	20	460	0.425		4	62	11	229	0.545		3	63	9	231	0.48	
HLA-G*010102a/HLA-G*01:06	4	128	21	459	0.343		3	63	14	226	0.481		1	65	7	233	0.46	
HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02	28	104	111	369	0.368		15	51	53	187	0.616		13	53	58	182	0.28	
HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:03	3	129	28	452	0.069		1	65	14	226	0.128		2	64	14	226	0.29	
HLA-G*0104a/HLA-G*01:04***	12	120	63	417	0.134		6	60	29	211	0.333		6	60	34	206	0.19	
HLA-G*0104a/HLA-G*01:01:08	2	130	6	474	0.447		2	64	2	238	0.204		0	66	4	36	0.38	
HLA-G*010101b/HLA-G*01:01:01	8	124	11	469	0.032	2.75 (1.08-6.98)	2	64	6	234	0.447		6	60	5	235	0.02	4.70 (1.38-15.92)
HLA-G*010101c/HLA-G*01:01:01	2	130	22	458	0.079		1	65	15	225	0.104		1	65	7	233	0.46	
HLA-G*0103a/HLA-G*01:03	2	130	12	468	0.389		1	65	8	232	0.387		1	65	14	236	0.71	
	132		480				66		240				66		240			

+ Presence ; - absence.

* Haplotypes with frequency lower than 0.01 were disregarded.

** *HLA-G*01:03* – includes alleles *HLA-G*01:03:01* e *G*01:03*.*** *HLA-G*01:04* – includes alleles *HLA-G*01:04:01*, *G*01:04:03*, *G*01:04:04*, *G*01:04:05* e *G*01:04*.

Table 5

Genotype frequency of 5'URR and coding region of *HLA-G* gene in ART couples (n=66) and control couples (n=240).

<i>HLA-G</i> Haplotypes*															
	ART Couples Successful		ART Couples Unsuccessful		P	ART Women Successful		ART Women Unsuccessful		P	ART Men Successful		ART Men Unsuccessful		P
	+	-	+	-		+	-	+	-		+	-	+	-	
<i>HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01</i>	11	53	7	61	0.18	5	27	3	31	0.32	6	26	4	30	0.32
<i>HLA-G*0103d/HLA-G*01:03**</i>	1	63	0	68	0.48						1	31	0	34	0.48
<i>HLA-G*0103e/HLA-G*01:03</i>	1	63	0	68	0.48	1	31	0	34	0.48					
<i>HLA-G*010101d/HLA-G*01:01:01</i>	0	64	1	67	0.51						0	32	1	33	0.51
<i>HLA-G*010101e/HLA-G*01:01:01</i>	4	60	3	65	0.46	2	30	2	32	0.67	2	30	1	33	0.47
<i>HLA-G*010102a/HLA-G*01:06</i>	3	61	1	67	0.28	2	30	1	33	0.47	1	31	0	34	0.48
<i>HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02</i>	13	51	15	53	0.48	6	26	9	25	0.32	7	25	6	28	0.45
<i>HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:03</i>	1	63	2	66	0.52	0	32	1	33	0.51	1	31	1	33	0.73
<i>HLA-G*0104a/HLA-G*01:04***</i>	3	61	9	59	0.07	1	31	5	29	0.11	2	30	4	30	0.36
<i>HLA-G*0104a/HLA-G*01:01:08</i>	1	63	1	67	0.73	1	31	1	33	0.73					
<i>HLA-G*010101b/HLA-G*01:01:01</i>	4	60	4	64	0.60	2	30	0	34	0.23	2	30	4	30	0.36
<i>HLA-G*010101c/HLA-G*01:01:01</i>	2	62	0	68	0.23	1	31	0	34	0.48	1	31	0	34	0.48
<i>HLA-G*0103a/HLA-G*01:03</i>	0	64	2	66	0.26	0	32	1	33	0.51	0	32	1	33	0.51

+ Presence ; - absence.

* Haplotypes with frequency lower than 0.01 were disregarded.

** *HLA-G*01:03* – includes alleles *HLA-G*01:03:01* e *G*01:03*.*** *HLA-G*01:04* – includes alleles *HLA-G*01:04:01*, *G*01:04:03*, *G*01:04:04*, *G*01:04:05* e *G*01:04*.

CAPÍTULO II

Variabilidade de KIR2DL4 e HLA-G influenciam no sucesso implantacional

COSTA, CH¹; GELMINI, GF¹; NARDI, FS¹; ROXO, VMS¹; SCHUFFNER, A²; BICALHO, MG¹.

¹Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR), Brasil.

² Centro de Medicina Reprodutiva Conceber, Curitiba (PR), Brasil.

RESUMO

O gene *HLA-G* codifica para uma proteína classe I não clássica (Ib) que tem suma importância na imunotolerância da interface materno-fetal, tendo como um importante receptor o KIR2DL4 expresso nas células uNK. Objetivou-se elucidar a existência de uma possível relação KIR2DL4 com o ligante HLA-G como determinante no sucesso reprodutivo. Neste estudo, 42 casais submetidos a tratamento de reprodução assistida (TRA) (n=84) e 120 casais com concepção natural (n=240), controles, mais 35 mulheres grávidas (n=35) foram genotipados. Comparou-se a diversidade de KIR2DL4 (alélica e genotípica) entre os grupos através do Teste Exato de Fisher. Os haplótipos de KIR2DL4 mais HLA-G foram inferidos e comparados entre os grupos. A combinação entre os genótipos *HLA-G* do casal associado ao genótipo materno de *KIR2DL4* foram comparados entre os grupos. Genótipos F1 foram inferidos por quadrado de Punnett a partir dos genótipos parentais. As comparações em todos os níveis foram feitas entre os casais e estratificando pelo sexo, bem como considerando o resultado do TRA, sucesso, implantação bem sucedida, vs insucesso. O alelo *KIR2DL4*00102* indicou-se significativamente mais frequente em casais controle e em casais com sucesso no TRA (p=0,05; OR=0,63; IC=0,36-1,08), já o alelo *KIR2DL4*011* foi observado com maior frequência em casais caso (p=0,02; OR=1,57; IC=0,97-2,55). O genótipo *KIR2DL4*00102/KIR2DL4*00801* apresentou-se, com significância, maior frequência no grupo controle (p=0,05; OR=0,28; IC=0,06-1,24). Na comparação de haplótipos, o haplótipo 3 (*HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01/KIR2DL4*00102*) esteve significativamente mais frequente em casais controles (p=0,05; OR=0,28; IC=0,06-1,23), já o

haplótipo 4 (*HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00102*) apresentou-se com maior frequência em homens controle ($p=0,02$; $OR=0,20$; $IC=0,02-1,55$), enquanto o haplótipo 5 (*HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00501*) foi mais frequente em mulheres com sucesso no TRA ($p=0,04$; $OR=6,85$; $IC=0,75-62,06$). Entre os genótipos do casal, o genótipo materno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:03* e o genótipo paterno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01* indicou, com significância, maior frequência nos casais controle ($p=0,03$; $OR=0,20$; $IC=0,02-1,61$). No genótipo F1 observou-se maior frequência do genótipo *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01* em filhos de casais controle ($p=0,03$; $OR=0,50$; $IC=0,24-1,03$), já o genótipo *HLA-G*01:01/HLA-G*01:05N* em filhos de casais caso ($p=0,03$; $OR=10,82$; $IC=1,11-104,80$). Evidenciando-se uma suposta influência dos genes *KIR2DL4* e *HLA-G* na fertilidade do casal e também no sucesso implantacional observado após TRA. Além da importância dos genótipos parentais, o genótipo do embrião poderia influenciar no estabelecimento de uma etapa implantacional bem sucedida, que não é unilateralmente determinada pelo genótipo materno, conforme reportado em estudos anteriores relacionados ao sucesso gestacional.

PALAVRAS-CHAVE

Interface materno-fetal, proteína HLA-G, receptor KIR2DL4, reprodução humana.

INTRODUÇÃO

Descrito por Geraghty *et al.*, em 1987, o gene *HLA-G* está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), numa região denominada *Major Histocompatibility Complex* (MHC), onde situam-se os genes mais polimórficos já descritos no genoma humano (MEHRA e KAUR, 2003), e apresenta organização gênica semelhante aos genes *HLA* classe I clássicos (Ia), com 8 exons, 7 introns e região 3'UTR (GERAGHTY *et al.*, 1987).

O gene *HLA-G* teve sua importância enfatizada por Ellis *et al.*, 1990 e, pelo fato de apresentar características distintas dos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-Cw* de Classe I denominados clássicos (Ia) foi denominado não clássico (Ib). Dentre essas características destacam-se sua expressão tecido específica, tendo sido descrito inicialmente na interface materno-fetal (GERAGHTY *et al.*, 1987; ELLIS *et al.*, 1986), posteriormente, sendo detectada também no fígado, olhos, coração, pulmão e rins fetais, além do timo, queratinócitos, células B e T, baço, fígado e rins em adultos (LE BOUTEILLER, 1994).

A região promotora apresenta elementos reguladores de ação *cis* alterados o que modifica a afinidade para alguns fatores transcricionais característicos de genes MHC Ia (GERAGHTY *et al.*, 1987; GOES *et al.*, 1995; GOBIN *et al.*, 1997; RIZZO *et al.*, 2009). Esta região apresenta número menor de alelos e diferenças quanto ao padrão da diversidade genética observada nos exons 2, 3 e 4, que é menor quando comparada aos genes clássicos. Uma maior diversidade genética é observada em sua região reguladora.

Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da proteína HLA-G, como nas demais proteínas de Classe I, são responsáveis pela formação da fenda de ligação ao peptídeo. Apresenta, portanto, estrutura funcional para apresentar peptídeos aos linfócitos T. O domínio $\alpha 3$ da proteína HLA-G é alvo do reconhecimento por receptores LIR-1 e LIR-2, expressos por células das linhagens linfocíticas, monocíticas e células dendríticas e funcionalmente relacionados aos receptores inibidores KIR das células NK (LEE *et al.*, 1995; DIEHL, *et al.*, 1996). A interação da proteína HLA-G com componentes celulares e moleculares da resposta imune induz, na maioria das vezes, inibição da resposta, fato esse que destaca sua importância no cenário complexo da imunotolerância.

Estão registrados no IMGT/HLA (out. de 2015) 50 alelos, 16 proteínas e 2 alelos nulos de *HLA-G*. Variantes alélicas de *HLA-G* tem sido associadas a variações nos níveis séricos da proteína (sHLA-G) (REBMANN *et al.*, 2001). Polimorfismos descritos nas regiões 5'URR e 3'UTR, também têm sido associados com a regulação gênica e níveis de expressão de *HLA-G* (HVIID *et al.*, 2006). Tendo por base, haplótipos inferidos de SNPs e o polimorfismos de *Ins/Del* de 14pb presentes, respectivamente, nas regiões 5'URR e 3'UTR de *HLA-G*, foi possível sugerir um mecanismo regulatório de sua expressão gênica, fundamentado no argumento de que SNPs específicos 5'URR associados com as variantes alélicas *Ins14pb* ou *Del14pb*, poderiam resultar numa maior ou menor expressão de *HLA-G* na interface materno-fetal (COSTA *et al.*, 2012).

A interface materno-fetal apresenta características imunológicas específicas, em parte atribuída à expressão diferencial dos genes HLA clássicos. Com exceção de *HLA-Cw*, as células do trofoblasto não expressam os genes *HLA-A* e *HLA-B* expressando caracteristicamente os genes de Classe I não clássicos, *HLA-G* e *HLA-E* (HUNTER *et al.*, 1998; LE BOUTEILLER *et al.*, 1999). Os altos níveis de expressão de *HLA-G*, nesta interface, parecem estar associados a uma atividade imunomoduladora fundamental na fisiologia gestacional (KING *et al.*, 1996).

No útero observam-se células *natural killer* específicas do útero (uNK), CD56⁺. Essa sub-população de células produz predominantemente citocinas e, apresenta menor potencial citotóxico sendo a única célula a expressar receptores KIR2DL4 (RAJAGOPALAN *et al.*, 2001), que apresentam interação específica com HLA-G (PONTE *et al.*, 1999).

O receptor KIR2DL4 é codificado pelo gene *KIR2DL4*, que integra o complexo gênico de receptores leucocitários (LCR), localizado no cromossomo 19q13.4 (WILSON *et al.*, 2000). Este gene foi selecionado evolutivamente como um gene estrutural, apresentando frequência de quase 100% na população (Tajik *et al.*, 2009).

O gene *KIR2DL4* possui oito éxons e seu produto protéico, o receptor KIR2DL4, destaca-se por apresentar motivos imunoreguladores de inibição (ITIMs) e ativação (ITAMs) em sua cauda citoplasmática (SELVAKUMAR *et al.*, 1996). Sua ação inibidora ou ativadora é dependente do contexto onde interage com seu ligante HLA-G (PONTE *et al.*, 1999). O resíduo asparagina no domínio transmembrana participa de sua função ativadora (RAJAGOPALAN *et al.*, 2001; KIKUCHI-MAKI *et al.*, 2003).

Uma importante deleção da primeira base (A) no códon 248, observada no exon 7, resulta em uma mudança de matriz de leitura que codifica uma proteína truncada com perda da região transmembrana; como resultado não há expressão do receptor na membrana das células uNK (GOODRIGDE *et al.*, 2003).

Assumindo que a interação entre a molécula HLA-G, que pode ser expressa pela células maternas e pelas células embrionárias, e o receptor KIR2DL4, expressas pelas células uNK maternas, é relevante na interface materno-fetal e na aceitação do feto (KOVATS *et al.*, 1990; VAN DER VEN *et al.*, 2000; ISHITANI *et al.*, 2003; LE PAGE *et al.*, 2014), no presente estudo buscou-se investigar a diversidade genética do gene *KIR2DL4* e a combinação genotípica de *HLA-G* dos casais e a inferência dos possíveis genótipos F1 e a possível associação com a infertilidade em casais submetidos a tratamento de reprodução assistida (TRA).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

O grupo paciente foi composto por 33 casais brasileiros inférteis (n=66) que realizaram tratamento de reprodução assistida (FIV- fertilização *in vitro*) no “Centro Médico de Reprodução – Conceber”, localizado em Curitiba, capital do estado de Paraná, sul do Brasil, entre Outubro 2009 e Março de 2014. Eles foram convidados a participar do estudo

com o objetivo de investigar a diversidade de *HLA-G* e *KIR2DL4* associada com as dificuldades da concepção natural e o sucesso ou falha da TRA, sendo o sucesso os nascidos-vivos. Os critérios de exclusão compreendem: idade materna >35 anos, endometriose, diminuição da função ovariana, volume ovariano < do que 3cm³; azoospermia obstrutiva, baixa resposta ao tratamento de estimulação produzindo menos que 12 folículos antrais ou 3 oócitos e níveis hormonais de FSH e estradiol superior a 10IU e 80 picogramas, respectivamente, sendo estes os níveis mínimos considerados pela Associação Americana de Reprodução para garantir o sucesso reprodutivo e não como uma resposta baixa ao tratamento.

No grupo controle foram convidados a participar 120 casais que conceberam naturalmente (n=240), não aparentados com os pacientes, com duas ou mais filhos e sem histórico de aborto idiopático ou outro problema reprodutivo. Casais pacientes e controles concordaram voluntariamente, assinando o termo de consentimento e preencheram ao questionário pessoal e ocupacional. Amostras de sangue foram coletadas entre Março de 2010 e Agosto de 2011 no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) no Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná – UFPR (Brasil). Os casais de ambos os grupos foram pareados de acordo com etnia e *status* social e econômico. O Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da UFPR (HC-UFPR) aprovou o estudo (CEP-HC nº037ext.019/2001-07).

Genotipagem KIR2DL4

A extração do DNA genômico nas amostras de ambos os grupos foi realizada pela técnica de *salting out*, descrita por Lahiri e Nurnberger (1991). O protocolo da reação de amplificação do DNA (PCR) foi realizada usando Taq 1X buffer (70 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,45 pM de cada dNTP, 2 mM MgCl, 2 U *Taq* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 e 20 pM de cada par de iniciador para a amplificação dos exon 4-5 e exon 7-9, respectivamente, e 50 ng/μL de DNA.

A amplificação de 5 exons (4, 5, 7, 8 e 9) de *KIR2DL4* foi realizada por dois fragmentos distintos, cada um com os seguintes pares de iniciadores: 4-5 exon: *forward* TGGTCAGGACAAGCCCTTCTGC, *reverse* TCCTCACCTGTGACAGAAACAG, e 7-9 exon: *forward* CCTGCATGCTGTGATTAGGTA, *reverse* TCAGATTCCAGCTGCGGTAC, resultando em produtos de PCR de 1458 bp e 974 bp, respectivamente.

O ciclo de denaturação inicial foi de 96°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de 96°C por 30 seg, 63°C por 30 seg e 72°C por 1 min; e uma extensão final a 72°C por 5 min. Para remover o excesso de iniciadores e dNTPs, o amplicon resultante foi purificado com 10 U de Exonuclease I e 1 U de Fosfatase Alcalina de Camarão (*Shrimp Alkaline Phosphatase* - SAP) (USB Corporation, Staufen, Alemanha), seguido pela reação de sequenciamento com ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, CA, USA) com os iniciadores da reação de PCR e iniciadores internos para observar produtos menores.

Os iniciadores da reação de sequenciamento foram: 4 exon: *forward* TGGTCAGGACAAGCCCTTCTGC, *reverse* CTGTGACCATGATCACCAGGG, 5 exon: *forward* TATATGAGAAACCTTCGCTTA, *reverse* TCCTCACCTGTGACAGAAACAG, 7 exon: *forward* CCTGCATGCTGTGATTAGGTA, *reverse* TCTGTGAGCTGAAGGCAGGGG, e 9 exon: *forward* TCAGGATTTCCCTCTCTCCAG, *reverse* TCAGGATTTCCCTCTCTCCAG (VARGAS, 2009). Os produtos sequenciados foram sequenciados por eletroforese pelo sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). Todas as sequências obtidas foram alinhadas utilizando o SeqScape Software versão 2.5 (Applied Biosystems, CA, USA) e comparadas com a sequência FASTA obtida no banco Ensemble. Posteriormente, cada SNP detectado foi individualmente anotado.

Genotipagem HLA-G

A extração do DNA genômico nas amostras de ambos os grupos foi realizada pela técnica de *salting out*, descrita por Lahiri e Nurnberger (1991). O protocolo da reação de amplificação do DNA (PCR) foi realizada usando Taq 1X buffer (70 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,45 pM de cada dNTP, 2 mM MgCl, 2 U Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 pM de cada par de iniciador para a amplificação da região promotora 5'URR e exon 2, 3 e 4 e 50 ng/μL de DNA.

Devida a extensão da região 5'URR (1500pb) optou-se por realizar a amplificação em três fragmentos, através do uso de 3 pares de *primers* (*Foward 1*: ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATG, *Reverse 1*: GTGTGCC TTTGAATCCCGATGC, *Foward 2*: CTGTGAGGTGAATAAAGTTTGTGC e *Reverse 2*: TGTGACTCTGTCTTGCAACCG, (descrito por SILVA, 2009) *Foward 3*: TCTTCTAGAAGAGTA e *Reverse 3*: GTTTCCTCCTGACCCCGCACT) com temperatura de anelamento de 66°C e tamanho dos fragmentos 638pb, 637pb e 562pb, respectivamente. A

região codificadora do gene *HLA-G* com os exons 2, 3 e 4 amplificados por 3 pares de *primers* distintos (*Forward*: GGGTCGGGCGGGTCTCAA e *Reverse*: TCCGTGGGGCATGGAGGT, para o exon 2, *Forward*: CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG e *Reverse*: CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA, para o exon 3, *Forward*: CCATGAGAGATGCAAAGTGCT e *Reverse*: TGCTTTCCCTAACAGACATGAT, para o exon 4), com temperaturas de anelamento de 66°, 68° e 66°, e tamanho dos fragmentos 588pb, 456pb e 364pb, respectivamente, conforme descrito por CASTELLI *et al.*, 2007.

A PCR atendeu às mesmas as condições de uma denaturação inicial a 96°C por 5', 35 ciclos de 96°C por 1', temperatura de anelamento do par de *primer* específico por 30'' e 72°C por 30'' e um anelamento final de 72°C por 5'. Após essa etapa, ocorreu a purificação dos produtos amplificados utilizando-se as enzimas Exonuclease I (EXO I) (10U) e SAP (1U) (USB Corporation, Staufen, Alemanha) e produto de PCR (concentração aproximada de 100 ng), volume final de 10 µL, 37°C por 60' e 80°C por 15'.

Na reação de sequenciamento do gene *HLA-G* foram utilizados os mesmos *primers* da reação de amplificação. A reação utiliza o *kit Big Dye v.3.1* da *ABI PRISM®* (Applied Biosystems, CA, USA), sendo as condições de 35 ciclos de 96°C por 15'', 54°C por 15'' e 60° por 4' e um anelamento final de 72°C por 5'. O produto de amplificação é purificado com etanol e a análise ocorre no sequenciador *ABI3130* ou *ABI3500* (Applied Biosystems, CA, USA). Todas as sequências obtidas foram alinhadas utilizando o SeqScape Software versão 2.5 (Applied Biosystems, CA, USA) e comparadas com a sequência FASTA obtida no banco Ensemble. Posteriormente, cada SNP detectado foi individualmente anotado.

Análise estatística

Frequências alélicas e genótípicas foram determinadas por contagem direta. Os alelos com frequência menor do que 0,01 (1%) não foram considerados nas comparações.

Para avaliar a concordância entre os genótipos observados e os previstos pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como as comparações entre os grupos, realizou-se o teste do χ^2 ou o teste Exato de Fisher usando o GENEPOP versão 4.0.10 com significância $p \leq 0.05$. Odds ratios (OR) foram calculados utilizando o programa BIOESTAT 5.0 com intervalo de confiança (IC) de 95% aceitando o aumento do risco de infertilidade dos pacientes comparando com controles.

Quando apropriado (alelos e haplótipos) para avaliar erros do tipo I (resultados falso positivo) aplicou-se a correção de Bonferroni, multiplicando assim o valor de p pelo número de comparações feitas (BLAND and ALTMAN, 1995).

As frequências de haplótipo inferidos foram realizadas com ARLEQUIN versão 3.11. O algoritmo de maximização da expectativa foi utilizado determinando a frequência haplotípica de SNP na região 5'URR e alelos do gene *HLA-G* e do gene *KIR2DL4* (1,000 *bootstrap*) cut-off=0,01 e valores de desequilíbrio de ligação (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

O genótipo de *HLA-G* dos embriões foi estimado baseado nos genótipos paternos, por aplicação do quadrado de Punnett e a comparação entre os grupo caso e controle foi realizada pelos teste χ^2 ou Exato de Fisher, conforme o n analisado na comparação.

RESULTADOS

Análises em ambos os grupos, casos e controles, mostraram a população em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os alelos 5'URR, alelos da região codificadora do gene *HLA-G* e alelos do gene *KIR2DL4*. Nas comparações entre grupos, não foram considerados alelos com frequências inferiores a 0,01.

Na Tabela I estão representados os diferentes alelos do gene *KIR2DL4* e suas respectivas frequências e comparações entre os grupos caso e controle e, também estratificados no sexo feminino, uma vez que a interação com o receptor acontece apenas com as células NK da mãe, não foram realizadas comparações em nenhum nível apenas considerando o sexo masculino. As frequências alélicas foram comparadas entre casais inférteis considerando-se o resultado de sucesso vs falha após o tratamento de reprodução assistida (TRA). O alelo *KIR2DL4*00102* foi significativamente mais frequente os entre casais controles (p=0.02; OR=0.54; CI=0.29-0.99).

Considerando-se a resposta ao tratamento, ou seja, casais com sucesso e casais com insucesso implantacional, observou-se que o alelo *KIR2DL4*006* foi significativamente mais frequente em casais com sucesso (p=0.05; OR=5.65; CI=0.64-49.76), enquanto o alelo *KIR2DL4*00801* apresentou-se significativamente mais frequente nos casais com insucesso do que nos com sucesso (p=0.03; OR=0.36; CI=0.14-0.96). Nenhuma diferença foi observada quando das comparações estratificadas por sexo foi realizada entre as mulheres inférteis e mulheres controle, e entre as mulheres considerando o resultado do TRA.

Na Tabela I estão também relacionados os alelos de *KIR2DL4* após agrupamento considerando-se o polimorfismo de deleção da primeira base (A) do códon 248 no exon 7, assim definidos: Grupo 1 incluindo os alelos *KIR2DL4*00102*, *KIR2DL4*00103*, *KIR2DL4*00501* e *KIR2DL4*006* (com 10A no exon 7) e alelos do Grupo 2: *KIR2DL4*00801*, *KIR2DL4*00802* e *KIR2DL4*011* (grupo com 9A no exon 7) (GOODRIGDE *et al.*, 2003).

Das comparações entre casais inférteis vs casais controle, na estratificação pelo sexo feminino e considerando o resultado do TRA, entre casais e entre mulheres, nenhuma diferença significativa na distribuição dos alelos do gene *KIR2DL4* foi observada entre as categorias analisadas.

Na Tabela II estão representados os diferentes genótipos *KIR2DL4* e suas respectivas frequências e comparações entre os grupos caso e controle e, também estratificados pelo sexo feminino. As frequências genótípicas foram comparadas entre casais inférteis considerando-se o resultado após o TRA (dados não mostrados).

Na comparação entre casais caso e casais controle observou-se o genótipo *KIR2DL4*00801/KIR2DL4*00802* significativamente mais frequente em casais inférteis o que no grupo de casais controle ($p=0.04$; OR=3.04; CI=1.09-8.51). Não foi observada nenhuma diferença significativa nas comparações genótípicas estratificadas para mulheres e nas comparações considerando o resultado do TRA entre os casais com sucesso e insucesso e entre as mulheres com sucesso e insucesso (dados não apresentados).

Na Tabela II também estão relacionados os genótipos após agrupamento dos alelos de *KIR2DL4* considerando-se o polimorfismo de deleção da primeira base (A) do códon 248 no exon 7 em alelos do Grupos 1 (com 10A no exon 7) e Grupo 2 (grupo com 9A) (GOODRIGDE *et al.*, 2003).

Das análises e comparações das frequências de genótipos dos Grupos 1 e 2 de alelos *KIR2DL4* pode-se observar que não houve diferença significativa os genótipos em nenhuma das comparações entre casais inférteis e casais controles, mulheres inférteis e mulheres controle. Bem como aquelas comparações considerando o resultado da TRA entre casais com sucesso e casais com falha na implantação e entre mulheres com sucesso e mulheres com falha implantacional não revelaram diferenças significativas (dados não mostrados).

Na Tabela III estão representadas as frequências haplotípicas inferidas de combinações entre região codificadora e 5'URR de *HLA-G* (descritas por Costa *et al.*, 2016) e

KIR2DL4; somente as combinações mais frequentes na população estudada estão relacionadas (cut-off=0,01) nas comparações entre os grupos totais e estratificados por sexo.

Dentre os haplótipos mais frequentes observou-se que, os haplótipos 16 e 21, estavam presentes apenas no grupo controle; dezenove haplótipos foram descritos tanto no grupo controle quanto no grupo caso.

A Tabela IV mostra as comparações dos 21 haplótipos mais comumente observados e, comparações entre os grupos totais e considerando o resultado de TRA entre os casais com sucesso implantacional e casais com falha de implantação e entre mulheres com sucesso no TRA e mulheres com falha no TRA. O haplótipo 16, ausente no grupo de casais inférteis, apresentou uma diferença significativa na comparação de entre casais inférteis e casais controles ($p=0.05$; $OR=0.29$; $CI=0.03-2.27$), no entanto essa diferença significativa não se manteve quando as comparações foram realizadas entre as mulheres. O haplótipo 21, apesar de também estar ausente no grupo de casais inférteis não apresentou diferença significativa quando comparadas às distribuições haplotípicas entre casais inférteis e casais controle e mulheres inférteis e mulheres controle. O haplótipo 3 indicou uma frequência significativamente maior no grupo de casais com sucesso no TRA do que em casais com falha no TRA ($p=0.04$; $OR=6.93$; $CI=0.81-59.26$).

Nas comparações estratificadas de acordo com o sexo, não se observou diferença significativa entre mulheres inférteis e mulheres controle (dados não apresentados). No entanto, nas comparações entre mulheres considerando o resultado do TRA, o haplótipo 3 manteve-se significativamente mais frequente em mulheres com sucesso no TRA do que mulheres com falha no TRA ($p=0.04$; $OR=6.25$; $CI=0.69-56.62$) (Tabela IV).

Na tabela V estão relacionadas as comparações entre genótipos da região codificadora de *HLA-G* maternos e paternos entre casais dos grupos caso e controles. Foi possível observar que a combinação resultante do genótipo materno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:03* e do genótipo paterno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01*, foi apenas observada entre casais do grupo controle ($p=0.03$; $OR=0.22$; $CI=0.02-1.77$); outras 14 combinações genotípicas materno/paterno foram também observadas somente entre casais do grupo controle, assim como as 4 combinações observadas apenas nos casais do grupo caso, sem nenhuma diferença estatística significante (Tabela V).

Quando nas comparações adicionou-se o genótipo materno *KIR2DL4*, já as comparações entre homens caso e homens controle não foram consideradas, uma vez que a interação na interface materno-fetal ocorre entre as moléculas de *HLA-G*, produzidas pelo

organismo materno e fetal (FUZZI *et al.*, 2002; KOTZE *et al.*, 2010; REBMANN *et al.*, 2010) e as células NK maternas para a reorganização tecidual local a fim de suprir as necessidades nutricionais e fisiológicas do feto, a combinação dos genótipos materno *KIR2DL4*00501/KIR2DL4*00501* e *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01* e o genótipo paterno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01* apresentou-se apenas nos casais do grupo caso e, ausentes nos casais do grupo controle, com uma diferença significativa nesta comparação ($p=0.04$; $OR=11.34$; $CI=1.14-112.75$) (dados não apresentados).

Na tabela VI foram inferidos os possíveis genótipos dos filhos (F1), tanto para o grupo caso quanto para o grupo controle. Das comparações entre os genótipos F1, pode-se estimar que o genótipo *HLA-G*01:01/HLA-G*01:03* apresentou-se em maior frequência entre filhos dos casais controle do que entre filhos dos casais caso ($p=0.03$; $OR=0.45$; $CI=0.20-1.01$). Quanto ao resultado da TRA e a distribuição dos prováveis genótipos dos filhos dos casais caso e controle, nenhuma diferença significativa foi observada.

Tabela I: Frequência alélica entre os grupos casais caso (n=66) e casais controle (n=240), os grupos mulheres caso (n=33) e mulheres controle (n=120) e os grupos de casais caso com sucesso no TRA (n=32) e casais caso com insucesso no TRA (n=34).

Alelos*	Casais caso		Casais controle		Valor P	OR (IC)	Mulheres caso		Mulheres controle		Valor P	Casais com sucesso no TRA		Casais com falha no TRA		Valor P	OR (IC)
	+	-	+	-			+	-	+	-		+	-	+	-		
KIR2DL4*00102	14 (0.11)	118 (0.89)	86 (0.18)	394 (0.82)	0.02	0.54 (0.29-0.99)	9 (0.14)	57 (0.86)	36 (0.15)	204 (0.85)	0.48	10 (0.16)	54 (0.84)	4 (0.06)	64 (0.94)	0.06	
KIR2DL4*00103	9 (0.07)	123 (0.93)	40 (0.08)	440 (0.93)	0.36		5 (0.07)	61 (0.93)	17 (0.07)	223 (0.93)	0.67	3 (0.05)	61 (0.95)	6 (0.09)	62 (0.91)	0.28	
KIR2DL4*00501	29 (0.22)	103 (0.78)	93 (0.19)	387 (0.81)	0.32		13 (0.20)	53 (0.80)	46 (0.19)	194 (0.81)	0.61	14 (0.22)	50 (0.78)	15 (0.22)	53 (0.78)	0.57	
KIR2DL4*006	4 (0.03)	128 (0.97)	16 (0.03)	464 (0.97)	0.56		2 (0.03)	64 (0.97)	7 (0.03)	233 (0.97)	0.70	4 (0.06)	60 (0.94)	0 (0.00)	68 (1.00)	0.05	5.65 (0.64-49.76)
KIR2DL4*00801	24 (0.18)	108 (0.82)	93 (0.19)	387 (0.81)	0.43		10 (0.15)	56 (0.85)	48 (0.20)	192 (0.80)	0.24	7 (0.11)	57 (0.89)	17 (0.25)	51 (0.75)	0.03	0.36 (0.14-0.96)
KIR2DL4*00802	22 (0.16)	110 (0.84)	69 (0.14)	411 (0.86)	0.28		11 (0.16)	55 (0.84)	40 (0.16)	200 (0.84)	0.58	9 (0.14)	55 (0.86)	13 (0.19)	55 (0.81)	0.29	
KIR2DL4*011	25 (0.19)	107 (0.81)	67 (0.14)	413 (0.86)	0.11		14 (0.21)	52 (0.79)	33 (0.14)	207 (0.86)	0.12	14 (0.22)	50 (0.78)	11 (0.16)	57 (0.84)	0.27	
Grupo 1 ¹	56 (0.42)	76 (0.58)	235 (0.49)	245 (0.51)	0.11		29 (0.44)	37 (0.56)	106 (0.44)	134 (0.56)	0.54	31 (0.48)	33 (0.52)	25 (0.37)	43 (0.63)	0.12	
Grupo 2 ²	71 (0.54)	61 (0.46)	229 (0.48)	251 (0.52)	0.12		35 (0.53)	31 (0.47)	121 (0.58)	119 (0.42)	0.40	30 (0.47)	34 (0.53)	41 (0.60)	27 (0.40)	0.09	

TRA=Tratamento de reprodução assistida

+ : presença do alelo; -: ausência do alelo

* Alelos com frequência maior que 1% (cut-off=0.01)

¹ Grupo 1 - *KIR2DL4*00102*, *KIR2DL4*00103*, *KIR2DL4*00501*, *KIR2DL4*006*

² Grupo 2 - *KIR2DL4*00801*, *KIR2DL4*00802*, *KIR2DL4*011*

OR= Odds Ratios

Tabela II: Comparação das frequências genotípicas de KIR2DL4 entre os grupos de casais caso submetidos a TRA (n=66) e casais controle (n=240) e os grupos de mulher caso submetidas a TRA (n=33)** e mulheres controle (n=120)**.

Genótipos***	Casais caso		Casais controle		Valor P	OR (IC)	Mulheres caso		Mulheres controle		Valor P
	+	-	+	-			+	-	+	-	
<i>KIR2DL4*00102/KIR2DL4*00102</i>	1 (0.01)	65 (0.99)	7 (0.03)	233 (0.97)	0.45		1 (0.03)	32 (0.97)	3 (0.02)	117 (0.98)	0.79
<i>KIR2DL4*00102/KIR2DL4*00103</i>	0 (0.00)	66 (1.00)	2 (0.01)	238 (0.99)	0.61						
<i>KIR2DL4*00102/KIR2DL4*00501</i>	3 (0.04)	63 (0.96)	16 (0.06)	224 (0.94)	0.38		1 (0.03)	32 (0.97)	4 (0.03)	116 (0.97)	0.70
<i>KIR2DL4*00102/KIR2DL4*006</i>	1 (0.01)	65 (0.99)	3 (0.01)	237 (0.99)	0.79		0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78
<i>KIR2DL4*00102/KIR2DL4*00801</i>	2 (0.03)	64 (0.97)	19 (0.08)	221 (0.92)	0.13		2 (0.06)	31 (0.94)	8 (0.06)	112 (0.94)	0.63
<i>KIR2DL4*00102/KIR2DL4*00802</i>	1 (0.01)	65 (0.99)	13 (0.05)	227 (0.95)	0.15		1 (0.03)	32 (0.97)	10 (0.08)	110 (0.92)	0.27
<i>KIR2DL4*00102/KIR2DL4*011</i>	5 (0.07)	61 (0.93)	14 (0.06)	226 (0.94)	0.36		3 (0.09)	30 (0.91)	4 (0.03)	116 (0.97)	0.13
<i>KIR2DL4*00103/KIR2DL4*00103</i>	0 (0.00)	66 (1.00)	7 (0.03)	233 (0.97)	0.18		0 (0.00)	33 (1.00)	3 (0.02)	117 (0.98)	0.48
<i>KIR2DL4*00103/KIR2DL4*00501</i>	1 (0.01)	65 (0.99)	9 (0.04)	231 (0.96)	0.33		0 (0.00)	33 (1.00)	6 (0.05)	114 (0.95)	0.22
<i>KIR2DL4*00103/KIR2DL4*006</i>	0 (0.00)	66 (1.00)	1 (0.01)	239 (0.99)	0.78						
<i>KIR2DL4*00103/KIR2DL4*00801</i>	4 (0.06)	62 (0.94)	9 (0.04)	231 (0.96)	0.36		2 (0.06)	31 (0.94)	3 (0.02)	117 (0.98)	0.22
<i>KIR2DL4*00103/KIR2DL4*00802</i>	1 (0.01)	65 (0.99)	2 (0.01)	238 (0.99)	0.40		0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78
<i>KIR2DL4*00103/KIR2DL4*011</i>	2 (0.03)	64 (0.97)	2 (0.01)	238 (0.99)	0.20		2 (0.06)	31 (0.94)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.11
<i>KIR2DL4*00501/KIR2DL4*00501</i>	4 (0.06)	62 (0.94)	10 (0.04)	230 (0.96)	0.35		2 (0.06)	31 (0.94)	5 (0.04)	115 (0.96)	0.47
<i>KIR2DL4*00501/KIR2DL4*006</i>	1 (0.01)	65 (0.99)	3 (0.01)	237 (0.99)	0.79		1 (0.03)	32 (0.97)	3 (0.02)	117 (0.98)	0.79
<i>KIR2DL4*00501/KIR2DL4*00801</i>	3 (0.04)	63 (0.96)	16 (0.13)	224 (0.87)	0.38		1 (0.03)	32 (0.97)	5 (0.04)	115 (0.96)	0.62
<i>KIR2DL4*00501/KIR2DL4*00802</i>	5 (0.07)	61 (0.93)	12 (0.05)	228 (0.95)	0.24		2 (0.06)	31 (0.94)	7 (0.06)	113 (0.94)	0.69
<i>KIR2DL4*00501/KIR2DL4*011</i>	5 (0.07)	61 (0.93)	11 (0.04)	229 (0.96)	0.25		3 (0.09)	30 (0.91)	7 (0.06)	113 (0.94)	0.30
<i>KIR2DL4*006/KIR2DL4*006</i>	0 (0.00)	66 (1.00)	1 (0.01)	239 (0.99)	0.78						
<i>KIR2DL4*006/KIR2DL4*00801</i>	0 (0.00)	66 (1.00)	3 (0.01)	237 (0.99)	0.48		0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78
<i>KIR2DL4*006/KIR2DL4*00802</i>	1 (0.01)	65 (0.99)	1 (0.01)	239 (0.99)	0.38		0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78
<i>KIR2DL4*006/KIR2DL4*011</i>	1 (0.01)	65 (0.99)	1 (0.01)	239 (0.99)	0.38		1 (0.03)	32 (0.97)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.38
<i>KIR2DL4*00801/KIR2DL4*00801</i>	2 (0.03)	64 (0.97)	8 (0.03)	232 (0.97)	0.63		1 (0.03)	32 (0.97)	6 (0.05)	114 (0.95)	0.53
<i>KIR2DL4*00801/KIR2DL4*00802</i>	7 (0.10)	59 (0.90)	9 (0.04)	231 (0.96)	0.04	3.04 (1.09-8.51)	2 (0.06)	31 (0.94)	5 (0.04)	115 (0.96)	0.47
<i>KIR2DL4*00801/KIR2DL4*011</i>	4 (0.06)	62 (0.94)	14 (0.06)	226 (0.94)	0.65		1 (0.03)	32 (0.97)	9 (0.07)	111 (0.93)	0.32
<i>KIR2DL4*00802/KIR2DL4*00802</i>	2 (0.03)	64 (0.97)	8 (0.03)	232 (0.97)	0.63		2 (0.06)	31 (0.94)	3 (0.02)	117 (0.98)	0.22
<i>KIR2DL4*00802/KIR2DL4*011</i>	3 (0.04)	63 (0.96)	9 (0.04)	231 (0.96)	0.48		2 (0.06)	31 (0.94)	3 (0.02)	117 (0.98)	0.22

Tabela II: Continuação

<i>KIR2DL4*011/KIR2DL4*011</i>	2 (0.03)	64 (0.97)	2 (0.01)	238 (0.99)	0.20	1 (0.03)	32 (0.97)	2 (0.01)	118 (0.99)	0.40
Grupo1/Grupo1	11 (0.17)	55 (0.83)	59 (0.24)	181 (0.76)	0.11	5 (0.15)	28 (0.85)	25 (0.21)	95 (0.79)	0.32
Grupo1/Grupo2	30 (0.45)	36 (0.55)	103 (0.43)	137 (0.57)	0.47	17 (0.51)	16 (0.49)	49 (0.41)	71 (0.59)	0.18
Grupo2/Grupo2	20 (0.30)	46 (0.70)	50 (0.21)	190 (0.79)	0.09	9 (0.27)	24 (0.73)	28 (0.23)	92 (0.77)	0.41

TRA= Tratamento de reprodução assistida

+ : presença do alelo; -: ausência do alelo

** n genótipo por somente por sexo, independente do parceiro

*** Alelos com frequência maior que 1% (cut-off=0,01)

OR=Odds Ratios

Tabela III: Frequência dos haplótipos inferidos de HLA-G (descrito por Costa et al., 2015) mais KIR2DL4 em casais caso submetidos a TRA e em casais controles, estratificados por sexo.

	HLA-G 5'URR/ HLA-G codificadora/ alelo KIR2DL4**	Caso		Controle		Frequência total
		Mulher	Homem	Mulher	Homem	
1	<i>HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01/KIR2DL4*00501</i>	0.06061	0.06061	0.04583	0.05833	0.22538
2	<i>HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00801</i>	0.06061	0.04545	0.05	0.05417	0.21023
3	<i>HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00501</i>	0.06061	0.04545	0.03333	0.04167	0.18106
4	<i>HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00102</i>	0.06061	0	0.05	0.06667	0.17727
5	<i>HLA-G*0104a/HLA-G*01:04/KIR2DL4*011</i>	0.04545	0.04545	0.025	0.04167	0.15758
6	<i>HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01/KIR2DL4*00102</i>	0.0303	0	0.03333	0.05833	0.12197
7	<i>HLA-G*0104a/HLA-G*01:04/KIR2DL4*00501</i>	0.0303	0.01515	0.02917	0.04167	0.11629
8	<i>HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01/KIR2DL4*011</i>	0.0303	0.01515	0.025	0.04167	0.11212
9	<i>HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00802</i>	0.04545	0.01515	0.025	0.025	0.11061
10	<i>HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01/KIR2DL4*00802</i>	0	0.0303	0.025	0.04583	0.10114
11	<i>HLA-G*0104a/HLA-G*01:04/KIR2DL4*00102</i>	0	0.01515	0.0375	0.03333	0.08598
12	<i>HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00103</i>	0	0.0303	0.025	0.02917	0.08447
13	<i>HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01/KIR2DL4*00801</i>	0	0.01515	0.0375	0.02917	0.08182
14	<i>HLA-G*010101f/HLA-G*01:01:01/KIR2DL4*00801</i>	0.01515	0.0303	0.02083	0.0125	0.07879
15	<i>HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01/KIR2DL4*00103</i>	0	0.01515	0.01667	0.02083	0.05265
16	<i>HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:03/KIR2DL4*00501</i>	0	0	0.02917	0.02083	0.05
17	<i>HLA-G*010101c/HLA-G*01:01:01/KIR2DL4*00802</i>	0.01515	0	0.01667	0.01667	0.04848
18	<i>HLA-G*010101f/HLA-G*01:01:01/KIR2DL4*00102</i>	0.0303	0	0.0125	0.00417	0.04697
19	<i>HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:03/KIR2DL4*00801</i>	0.01515	0	0.00833	0.02083	0.04432
20	<i>HLA-G*0104a/HLA-G*01:04/KIR2DL4*00801</i>	0	0.01515	0	0.0125	0.02765
21	<i>HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*011</i>	0	0	0.00833	0.00833	0.01667

TRA= Tratamento de reprodução assistida

**cut-off 0,01

Tabela IV: Comparação das frequências haplotípicas entre grupo de casais caso submetidos a TRA (n=66) e casais controle (n=240); entre casais com sucesso no TRA (n=32) e casais com insucesso no TRA (n=34); e entre grupos mulheres com sucesso no TRA (n=16) e mulheres com insucesso no TRA (n=17).

Haplótipos*	Casais caso		Casais controle		Valor P	OR (CI)	Casais com sucesso no TRA		Casais com falha no TRA		Valor P	OR (CI)	Mulheres com sucesso no TRA		Mulheres com falha no TRA		Valor P	OR (CI)
	+	-	+	-			+	-	+	-			+	-	+	-		
1	8 (0.06)	124 (0.94)	25 (0.05)	455 (0.95)	0.40		3 (0.05)	61 (0.95)	5 (0.07)	63 (0.93)	0.39		1 (0.03)	31 (0.97)	3 (0.08)	31 (0.92)	0.33	
2	7 (0.05)	125 (0.95)	25 (0.05)	455 (0.95)	0.61		3 (0.05)	61 (0.95)	4 (0.06)	64 (0.94)	0.53		1 (0.03)	31 (0.97)	3 (0.08)	31 (0.92)	0.33	
3	7 (0.05)	125 (0.95)	18 (0.04)	462 (0.96)	0.31		6 (0.09)	58 (0.91)	1 (0.01)	67 (0.99)	0.04	6.93 (0.81-59.26)	4 (0.12)	28 (0.88)	0 (0.00)	34 (1.00)	0.04	6.25 (0.69-56.62)
4	4 (0.03)	128 (0.97)	28 (0.06)	452 (0.94)	0.14		1 (0.01)	63 (0.99)	3 (0.04)	65 (0.96)	0.33		1 (0.03)	31 (0.97)	3 (0.08)	31 (0.92)	0.33	
5	6 (0.04)	126 (0.96)	16 (0.03)	464 (0.97)	0.42		2 (0.03)	62 (0.97)	4 (0.06)	64 (0.94)	0.37		1 (0.03)	31 (0.97)	2 (0.06)	32 (0.94)	0.52	
6	2 (0.01)	130 (0.99)	22 (0.04)	458 (0.96)	0.08		2 (0.03)	62 (0.97)	0 (0.00)	68 (1.00)	0.23		2 (0.06)	30 (0.94)	0 (0.00)	34 (1.00)	0.23	
7	3 (0.02)	129 (0.98)	17 (0.03)	463 (0.97)	0.34		0 (0.00)	64 (1.00)	3 (0.04)	65 (0.96)	0.13		0 (0.00)	32 (1.00)	2 (0.06)	32 (0.94)	0.26	
8	3 (0.02)	129 (0.98)	16 (0.03)	464 (0.97)	0.38		3 (0.05)	61 (0.95)	0 (0.00)	68 (1.00)	0.11		2 (0.06)	30 (0.94)	0 (0.00)	34 (1.00)	0.23	
9	4 (0.03)	128 (0.97)	12 (0.02)	468 (0.98)	0.51		0 (0.00)	64 (1.00)	4 (0.06)	64 (0.94)	0.07		0 (0.00)	32 (1.00)	3 (0.08)	31 (0.92)	0.13	
10	2 (0.01)	130 (0.99)	17 (0.03)	463 (0.97)	0.18		2 (0.03)	62 (0.97)	0 (0.00)	68 (1.00)	0.23							
11	1 (0.01)	131 (0.99)	17 (0.03)	463 (0.97)	0.07		1 (0.01)	63 (0.99)	0 (0.00)	68 (1.00)	0.48							
12	2 (0.01)	130 (0.99)	13 (0.03)	467 (0.97)	0.34		0 (0.00)	64 (1.00)	2 (0.03)	66 (0.97)	0.26							
13	1 (0.01)	131 (0.99)	16 (0.03)	464 (0.97)	0.09		0 (0.00)	64 (1.00)	1 (0.01)	67 (0.99)	0.51							

Tabela IV: Continuação

14	3 (0.02)	129 (0.98)	8 (0.01)	472 (0.99)	0.51		1 (0.01)	63 (0.99)	2 (0.03)	66 (0.97)	0.52		0 (0.00)	32 (1.00)	1 (0.03)	33 (0.97)	0.51
15	1 (0.01)	131 (0.99)	9 (0.02)	471 (0.98)	0.33		0 (0.00)	64 (1.00)	1 (0.01)	67 (0.99)	0.51						
16	0 (0.00)	132 (1.00)	12 (0.02)	468 (0.98)	0.05	0.29 (0.03-2.27)											
17	1 (0.01)	131 (0.99)	8 (0.01)	472 (0.99)	0.39		1 (0.01)	63 (0.99)	0 (0.00)	68 (1.00)	0.48		1 (0.03)	31 (0.97)	0 (0.00)	34 (1.00)	0.48
18	2 (0.01)	130 (0.99)	4 (0.01)	476 (0.99)	0.49		1 (0.01)	63 (0.99)	1 (0.01)	67 (0.99)	0.73		1 (0.03)	31 (0.97)	1 (0.03)	33 (0.97)	0.74
19	1 (0.01)	131 (0.99)	7 (0.01)	473 (0.99)	0.45		0 (0.00)	64 (1.00)	1 (0.01)	67 (0.99)	0.51		0 (0.00)	32 (1.00)	1 (0.03)	33 (0.97)	0.51
20	1 (0.01)	131 (0.99)	3 (0.01)	477 (0.99)	0.79		0 (0.00)	64 (1.00)	1 (0.01)	67 (0.99)	0.51						
21	0 (0.00)	132 (1.00)	4 (0.01)	476 (0.99)	0.37												

TRA = Tratamento de reprodução assistida

+ : presença do alelo; -: ausência do alelo

*cut-off = 0,01

OR= Odds Ratios

Tabela V: Comparação entre genótipo materno e genótipo paterno do gene HLA-G, entre casais caso submetidos a TRA (n=33) e casais controle (n=120).

Genótipo materno	Genótipo paterno	Case couples		Control couples		P value	OR
		+	-	+	-		
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	13 (0.39)	20 (0.61)	37 (0.31)	83 (0.69)	0.27	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:03</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	9 (0.07)	111 (0.93)	0.10	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	4 (0.12)	29 (0.88)	13 (0.11)	107 (0.89)	0.47	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:05N</i>	1 (0.03)	32 (0.97)	0 (0.00)	120 (1.00)	0.21	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:06</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	5 (0.04)	115 (0.96)	0.29	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	<i>HLA-G*01:03/HLA-G*01:04</i>	1 (0.03)	32 (0.97)	0 (0.00)	120 (1.00)	0.21	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:03</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	13 (0.11)	107 (0.89)	0.03	0.22 (0.02-1.77)
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:03</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:03</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:03</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	1 (0.03)	32 (0.97)	0 (0.00)	120 (1.00)	0.21	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:03</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:06</i>	1 (0.03)	32 (0.97)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.38	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:03</i>	<i>HLA-G*01:03/HLA-G*01:04</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	2 (0.01)	118 (0.99)	0.61	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:03</i>	<i>HLA-G*01:04/HLA-G*01:04</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	5 (0.15)	28 (0.85)	7 (0.06)	113 (0.94)	0.11	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:03</i>	1 (0.03)	32 (0.97)	3 (0.02)	117 (0.98)	0.79	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	2 (0.06)	31 (0.94)	8 (0.06)	112 (0.94)	0.63	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:05N</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:06</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	<i>HLA-G*01:03/HLA-G*01:04</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:06</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	1 (0.03)	32 (0.97)	5 (0.04)	115 (0.96)	0.61	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:06</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	2 (0.06)	31 (0.94)	4 (0.03)	116 (0.97)	0.49	
<i>HLA-G*01:03/HLA-G*01:04</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	3 (0.02)	117 (0.98)	0.48	
<i>HLA-G*01:03/HLA-G*01:06</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	1 (0.03)	32 (0.97)	0 (0.00)	120 (1.00)	0.21	
<i>HLA-G*01:04/HLA-G*01:04</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:03</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78	
<i>HLA-G*01:04/HLA-G*01:06</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78	
<i>HLA-G*01:04/HLA-G*01:06</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78	

Tabela VI: Continuação

<i>HLA-G*01:04/HLA-G*01:06</i>	<i>HLA-G*01:03/HLA-G*01:04</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78
<i>HLA-G*01:06/HLA-G*01:06</i>	<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	0 (0.00)	33 (1.00)	1 (0.01)	119 (0.99)	0.78

TRA = Tratamento de reprodução assistida

+ : presença do alelo; -: ausência do alelo

OR= Odds Ratios

Tabela VI: Genótipos inferidos para os embriões, entre o grupo caso (n=66) e o grupo controle (n=120); entre o sucesso no TRA (n=32) e insucesso no TRA (n=34).

Genótipo F1	Case group		Control group		P value	OR (CI)	Success in the TRA		Failure in the TRA		P value
	+	-	+	-			+	-	+	-	
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:01</i>	81 (0.61)	51 (0.39)	271 (0.56)	209 (0.44)	0.18	0.45 (0.20-1.01)	40 (0.62)	24 (0.38)	41 (0.60)	27 (0.40)	0.46
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:03</i>	7 (0.05)	125 (0.95)	53 (0.11)	427 (0.89)	0.03		4 (0.06)	60 (0.94)	3 (0.04)	65 (0.96)	0.46
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:04</i>	28 (0.21)	104 (0.79)	81 (0.17)	399 (0.83)	0.14		11 (0.17)	53 (0.83)	17 (0.25)	51 (0.75)	0.18
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:05N</i>	2 (0.01)	130 (0.99)	1 (0.002)	479 (0.998)	0.12		2 (0.03)	62 (0.97)	0 (0.00)	68 (1.00)	0.23
<i>HLA-G*01:01/HLA-G*01:06</i>	7 (0.05)	125 (0.95)	31 (0.06)	449 (0.941)	0.40		3 (0.05)	61 (0.95)	4 (0.06)	64 (0.94)	0.53
<i>HLA-G*01:03/HLA-G*01:03</i>	0 (0.00)	132 (1.00)	3 (0.006)	477 (0.994)	0.48						
<i>HLA-G*01:03/HLA-G*01:04</i>	2 (0.01)	130 (0.99)	14 (0.03)	466 (0.97)	0.29		1 (0.01)	63 (0.99)	1 (0.01)	67 (0.99)	0.73
<i>HLA-G*01:03/HLA-G*01:06</i>	1 (0.01)	131 (0.99)	2 (0.004)	478 (0.996)	0.40		1 (0.01)	63 (0.99)	0 (0.00)	68 (1.00)	0.48
<i>HLA-G*01:04/HLA-G*01:04</i>	2 (0.01)	130 (0.99)	14 (0.03)	466 (0.97)	0.29		0 (0.00)	64 (1.00)	2 (0.03)	66 (0.97)	0.26
<i>HLA-G*01:04/HLA-G*01:05N</i>	0 (0.00)	132 (1.00)	1 (0.002)	479 (0.998)	0.78						
<i>HLA-G*01:04/HLA-G*01:06</i>	2 (0.01)	130 (0.99)	9 (0.02)	471 (0.98)	0.56		2 (0.03)	62 (0.97)	0 (0.00)	68 (1.00)	0.23

TRA = Tratamento de reprodução assistida

+ : presença do alelo; -: ausência do alelo

OR= Odds Ratios

DISCUSSÃO

O gene *KIR2DL4* está presente na população como um gene de matriz da família KIR, ou seja, apesar do repertório de genes da família KIR ser distinta entre os indivíduos o gene *KIR2DL4* está presente na maioria dos indivíduos. Estudos sobre a frequência alélica demonstram que alguns de seus alelos são mais frequentes em diferentes populações, como Hong Kong (WILLIAMS *et al.*, 2004), China (ZHU *et al.*, 2006), caucasóides e ameríndios argentinos (FLORES *et al.*, 2007), Irlanda do Norte (MIDDLETON *et al.*, 2005), Polônia e Ucrânia (Niepiekto-Miniewska *et al.*, 2014) e na Índia (GUHA *et al.*, 2014). Entretanto, existem poucos estudos de associação entre esse gene e o sucesso gestacional, dentre os quais, com o abortamento de causa desconhecida (WITT *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2007; VARGAS, 2009), pré-eclampsia (LI *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2009) e fertilidade (NOWAK *et al.*, 2011).

Conforme descrito por Goodridge e cols., 2003, um importante polimorfismo no códon 248 do exon 7 do gene *KIR2DL4* é determinante para que o transcrito traduza um receptor com expressão na membrana ou no interior da célula uNK. Analisando este polimorfismo observa-se que o alelo *KIR2DL4*00102* foi mais frequente entre casais controle ($p=0.02$; OR=0.54; CI=0.29-0.99), já o alelo *KIR2DL4*006* foi mais frequente entre casais que quando submetidos ao TRA obtiveram sucesso do que em casais com falha no TRA ($p=0.05$; OR=5.65; IC=0.64-49.76), sugerindo um possível sucesso gestacional, pelo fato da proteína/receptor codificada por ambos os alelos se expressar na membrana das células uNK, uma vez que eles possuem uma base A não deletada no códon 248 do exon 7.

Contrariamente, aos alelos *KIR2DL4*00102* e *KIR2DL4*006*, o alelo *KIR2DL4*00801*, que apresenta no códon 248 do exon 7 uma deleção da primeira base que inviabiliza a expressão do receptor na membrana e o mantém no interior da célula, apresentou-se significativamente mais frequente em casais do grupo caso com falha no TRA do que em casais com sucesso ($p=0.03$; OR=0.36; CI=0.14-0.96). Essa associação é sugestiva de que o receptor por ele codificado não seria tão eficiente na interação com seu ligante HLA-G.

Pode-se observar também, uma maior frequência do genótipo *KIR2DL4*00801/KIR2DL4*00802* em casais do grupo caso ($p=0.04$; OR=3.04; CI=1.09-8.51). Este genótipo combina dois alelos que possuem a deleção da base A no códon 248 do exon 7, totalizando uma repetição de 9A. No que se refere à expressão dos receptores KIR2DL4 essa combinação genotípica seria desfavorável ao sucesso gestacional.

Estudos de associação, já publicados, entre o gene *KIR2DL4* e alterações gestacionais, apresentaram resultados diversos. No presente estudo, os alelos do Grupo 1 e do Grupo 2 não apresentaram diferença significativa em nenhuma das comparações realizadas. Em concordância aos estudos de Witt *et al.*, 2004, que não detectaram diferenças entre mulheres com histórico de aborto recorrente e mulheres controle, e o observado por Vargas e cols., em 2009 (dados não publicados).

Por outro lado, o grupo de Yan, 2007, relatou uma maior frequência da deleção no exon 7 (9A) em mulheres com aborto recorrente do que em mulheres controle. Essa deleção observada no exon 7 é característica dos alelos do Grupo 2, que codificam receptores que ficam retidos no interior das células uNK. Já os achados de Yan e cols., 2007, sugerem que a presença do receptor no interior da célula uNK poderia dificultar a ligação com a proteína HLA-G, pois a ligação ocorreria apenas pela forma solúvel da proteína pela via endossomal.

Estudos de associação entre o gene *KIR2DL4* com o desenvolvimento de pré-eclampsia discordam de nossos resultados, pois, conforme demonstrado por Li *et al.*, 2008, a menor expressão do receptor KIR2DL4 foi associado com os casos de pré-eclampsia. Tan *et al.*, 2009 estudaram a combinação do HLA-G e do KIR2DL4 com casos de pré-eclampsia, associando a combinação alélica *HLA-G*01:06* com *KIR2DL4*006* com a patologia.

Das observações obtidas das análises haplotípicas pode-se constatar que, o haplótipo 16 (*HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:03/KIR2DL4*00501*), ausente no grupo de casais caso, apresentou-se significativamente mais frequente em casais controle ($p=0.05$; $OR=0.29$; $CI=0.03-2.27$), quanto o haplótipo 3 (*HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00501*) foi mais frequente em casais com sucesso no TRA do que em casais com falha no TRA ($p=0.04$; $OR=6.93$; $CI=0.81-59.26$) e em mulheres com sucesso no TRA do que em mulheres com falha no TRA ($p=0.04$; $OR=6.26$; $CI=0.69-56.62$). Esses haplótipos resultaram da combinação entre alelos *HLA-G* – região promotora e codificadora – com alelos *KIR2DL4*. Conforme análise individualizada de alelos que compõem o haplótipo 16 e o haplótipo, foi descrito que o alelo da região promotora, *HLA-G*010102a*, estaria relacionado com uma regulação de baixa expressão gênica (COSTA et al., 2012), quanto aos alelos da região codificadora o alelo *HLA-G*01:01:03* já foi associado a níveis mais baixos de proteína HLA-G sérica (Rebman et al., 2001) e o alelo *HLA-G*01:01:02*, como descrito por Vargas et al., 2011, apresentou-se mais frequente em mulheres do grupo controle do que mulheres com AER, assim como o alelo *HLA-G*01:01:03*, sugerindo assim uma possível colaboração para o sucesso reprodutivo, principalmente se associado a variante alélica

*KIR2DL4*00501*, sugestiva de uma expressão de receptores na membrana das células NK das mulheres, o que tornaria a interação ligante-receptor adequada para o sucesso reprodutivo, sendo o esse déficit na expressão da proteína compensado pela expressão adequada dos receptores *KIR2DL4* na membrana das uNK, relacionando níveis normais/altos de receptores na membrana das uNK (GOODRIGDE *et al.*, 2003).

Na busca pela melhor compreensão da combinação entre genótipos paternos e maternos e o sucesso reprodutivo, observou-se que a combinação do genótipo materno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:03* e genótipo paterno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01* mostrou-se exclusivamente representada no grupo de casais controle, com diferença significativa nesta distribuição ($p=0.03$; $OR=0.22$; $CI=0.02-1.77$). Esta combinação de genótipos envolvendo alelos determinantes de altos níveis de expressão da proteína HLA-G (*HLA-G*01:01*) presente no genótipo paterno e um alelo determinante de baixa expressão protéica (*HLA-G*01:03*) sugere que há uma produção protéica satisfatória na interface materno fetal. No entanto, esta combinação de genótipo *HLA-G* paterno e materno acrescido do genótipo *KIR2DL4* materno apresentou a combinação *KIR2DL4*00501/KIR2DL4*00501*, genótipo materno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01* e genótipo paterno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01* significativamente maior em casais submetidos ao TRA do que casais controle ($p=0.04$; $OR=11.34$; $CI=1.14-112.75$), sugerindo que uma produção excessiva da proteína HLA-G, relacionada com a combinação dos genótipos homozigotos para *HLA-G*01:01*, em ambos os genitores, combinada com um genótipo materno *KIR2DL4*00501/KIR2DL4*00501*, relacionado com a expressão elevada de receptor na membrana das células uNK, pode tornar o cenário reprodutivo duvidoso, por um efeito de super dose.

Com os genótipos combinados do casal, foi possível inferir através de quadrado de Punnett os possíveis genótipos dos descendentes (F1) destes casais. Nesta comparação, o genótipo *HLA-G*01:01/HLA-G*01:03* mostrou-se significativamente mais frequente esperado entre filhos dos casais controle do que entre os filhos dos casais caso ($p=0.03$; $OR=0.45$; $CI=0.20-1.01$), esta evidência é sugestiva de que a expressão de HLA-G no sucesso implantacional não é unilateral, e sim determinado tanto pela mãe como pelo feto, corroborando o que já havia sido reportado em estudos anteriores considerando-se a dosagem de sHLA-G no sobrenadante da cultura de embriões (FUZZI *et al.*, 2002; KOTZE *et al.*, 2010; REBMANN *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

No presente estudo obtivemos evidências que sugerem a influência da variabilidade dos genes *KIR2DL4* e *HLA-G* na fertilidade do casal e também no sucesso implantacional observado após TRA. No entanto, ficou também evidente que não apenas os genótipos parentais podem ser determinantes da interação KIR-ligante (*HLA-G*) presentes na interface materno-fetal, mas também o genótipo do embrião poderia influenciar no estabelecimento de uma etapa implantacional bem sucedida, que não é unilateralmente determinada pelo genótipo materno, conforme reportado em estudos anteriores relacionados ao sucesso gestacional.

AGRADECIMENTOS

Nós somos muito gratos aos casais que aceitaram participar do estudo. Também agradecemos muito a Clínica Conceber e a equipe LIGH pelo suporte técnico recebido. Este estudo teve o apoio financeiro para a pesquisa da FUNPAR-LIGH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G.; **Multiple significance tests: The Bonferroni method**.BMJ, vol. 310, pp. 17-, 1995.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; ROGER, M.; MOREAU, P.; DONADI, E.A.; **A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution**. Mol Biol Evol, vol.28, pp. 3069-86, 2011.

COSTA, C.H.; GELMINI, G.F.; WOWK, P.F.; MATTAR, S.B.; VARGAS, R.G.; ROXO, V.M; SCHUFFNER, A.; BICALHO, M. da G.; **HLA-G r3egulatory haplotypes and implantation outcome in couples who underwent assisted reproduction treatment**. Hum Immunol, vol. 73, pp. 891-897, 2012.

COSTA, C.H.; GELMINI, G.F.; NARDI, F.S.; ROXO, V.M.; SCHUFFNER, A.; BICALHO, M.G.; **HLA-G profile of infertile couples who underwent assisted reproduction treatment**. Hum Immunol, vol. 77, pp. 1179-1186, 2016.

DIEHL, M.; MÜNZ, C.; KEILHOLZ, W.; STEVANOVIC, S.; HOLMES, N.; LOKE, Y.W.; RAMMENSEE, H.G.; **Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters.** Curr Biol, vol. 6, pp. 305, 1996.

EBMT disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>, acesso em: outubro 2015.

ELLIS, S.A.; SARGENT, I.L.; REDMAN, W.G.; MCMICHAEL, A.J.; **Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line.** Immunology, vol. 59, pp. 595, 1986.

ELLIS, S.A.; PALMER, M.S.; MCMICHAEL, A.J.; **Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule.** J Immunol, vol. 144, pp. 731, 1990.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S.; **Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis.** Evolutionary Bioinformatics Online vol. 1, pp. 47-50.

FLORES, A.C.; MARCOS, C.Y.; PALADINO, N.; CAPUCCHIO, M.; THEILER, G.; ARRUVITO, L.; PARDO, R.; HABEGGER, A.; WILLIAMS, F.; MIDDLETON, D.; FAINBOIM, L.; **KIR genes polymorphism in Argentinean Caucasoid and Amerindian populations.** Tissue Antigens, vol. 69, pp. 568-576, 2007.

FUZZI, B.; RIZZO, R.; CRISCUOLI, L.; NOCI, I.; MELCHIORRI, L.; SCARSELLI, B.; BENCINI, E.; MENICUCCI, A.; BARICORDI, O.R.; **HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy.** Eur J Immunogenetics, vol. 32, pp. 311, 2002.

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T.; **A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment.** Proc Nat Acad Sci USA, vol. 84, pp. 9145, 1987.

GOBIN, S.J.P.; KEIJERS, V.; WOLTMAN, A.M.; PEIJNENBURG, A.; WILSON, L.; VAN DEN ELSEN, P.J.; **Locus-specific regulation of HLA class I gene expression.** In.: D. Charron (ed): Genetic diversity of HLA. Func Med Implic vol. 2, pp. 295, 1997b.

GOES, N.; SIMS, T.; URMSON, J.; VINCENT, D.; RAMASSAR, V.; HALLORAN, P.F.; **Disturbed MHC regulation in the INF- γ knockout mouse. Evidence for three states of MHC expression with distinct roles for INF- γ .** J Immunol, vol. 155, pp. 4559, 1995.

GOODRIGDE, J.P.; WITT, C.S.; CHRISTIANSEN, F.T.; WARREN, H.S.; **KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cell.** J Immunol, vol. 171, pp. 1768-74, 2003.

GUHA, P.; BHATTACHARIEE, S.; CHAUDHURI, T.K.; **Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Bengali population of northern West Bengal, India.** Scand J Immunol, vol. 80, pp. 441-451, 2014.

HUNTER, H.; HAMMER, A.; DOHR, G.; HUNT, J.S.; **HLA expression at the maternal-fetal interface.** Dev Immunol, vol. 6, pp. 197-204, 1998.

HVIID, T.V.F.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; STIGNANI, M.; BARICORDI, O.R. **Polymorphism in the 5'upstream regulatory and 3'unstrated region of the HLA-G in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression.** Hum Immunol, v. 67, p. 53, 2006.

IMGT/HLA *Database* , disponível em <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>, acessado em outubro de 2015.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; LEE, N.; DOROFEEVA, N.; HATAKE, K.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E.; **Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functions roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition.** J Immunol, vol. 171, pp. 1376, 2003.

KIKUCHI-MAKI, A.; YUSA, S.; CAINA, T.L.; CAMPBELL, L.K.S.; **KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production.** J Immunol, vol. 171, pp. 3415-3425, 2003.

KING, A.; BURROWS, T.; LOKE, Y.W.; **Human uterine natural killer cells.** Nat Immunity, vol. 15, pp. 41, 1996.

KOTZE, D.J.; HANSEN, P.; KESKINTEPE, L.; SNOWDEN, E.; SHER, G.; KRUGER, T.; **Embryo selection criteria based on morphology VERSUS the expression of a biochemical marker (sHLA-G) and a graduated embryo score: prediction of pregnancy outcome.** J Assit Reprod Genet, vol. 27, pp. 309-16, 2010.

KOVATS, S.; MAIN, E.K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S.J.; DEMARS, R.; **A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblast.** Science, vol. 248, pp. 220, 1990.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I.; **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** Nucleic Acid Res, vol. 19, pp. 5444, 1991.

LARSEN, M.H.; HVIID, T.V.F.; **Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease.** Hum Immunol, vol. 70, pp. 1026-34, 2009.

LE BOUTEILLER, P.; **HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions.** Crit Rev Immunol, vol. 14, pp. 89, 1994.

LE BOUTEILLER, P.; SOLIER, C.; PRÖLL, J.; AGUERRE-GIRR, M.; FOURNEL, S.; LENFANT, F.; **Placental HLA-G expression *in vivo*: where and what?** Hum Reprod Up, vol. 5, pp. 223, 1999.

LE PAGE, M.E.L.; GOODRIDGE, J.P.; JOHN, E.; CHRISTIANSEN, F.T.; WITT, C.S.; **Killer Ig-like Receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN- γ responses to soluble HLA-G preparations.** J Immunol, vol. 192, pp. 732-740, 2014.

LEE, N.; MALACKO, A.R.; ISCHITANI, A.; CHEN, M.C.; BAJORATH, J.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E.; **The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association.** Immunity, vol. 3, pp. 591, 1995.

LI, Y.; ZHAO, Y.H.; ZHANG, W.Y.; CUI, M.H.; **Correlation between killer cell immunoglobulin-like receptors genes and pre-eclampsia.** Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, vol. 43, pp. 909-912, 2008.

MEHRA, N.K.; KAUR, G.; **Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region.** Exp Rev Mol Med, vol. 4, pp. 1, 2003.

MIDDLETON, D.; WILLIAMS, F.; HALFPENNY, I.A.; **KIR genes.** Transpl Immunol, vol. 14, pp. 135-142, 2005.

NIEPIEKTO-MINIESWSKA, W.; ZUK, N.; DUBIS, J.; **Two new cases of KIR3DP1, KIR2DL4-negative genotypes, one of which is also lacking KIR3DL2.** Arch Immunol Ther Exp, vol. 62, pp. 423-9, 2014.

NOWAK, I.; MAJORCZYK, E.; PLOSKI, R.; SENITZER, D.; SUN, J.Y.; KUSNIERCZYK, P.; **Lack of KIR2DL4 gene in a fertile Caucasian woman.** Tissue Antigens, vol. 78, pp. 115-9, 2011.

PONTE, M.; CANTONI, C.; BIASSONI, R.; TRADORI-CAPPAL, A.; BENTIVOGLIO, G.; VITALE, C.; BERTONE, S.; MORETTA, A.; MORETTA, L.; MINGARI, M.C.; **Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor.** Proc Nat Acad Sci USA, vol. 96, pp. 5674-5679, 1999.

RAJAGOPALAN, S.; FU, J.; LONG, E.O.; **Cutting edge: induction of INF-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells.** J Immunol, vol.168, pp. 6208-6214, 2001.

REBMANN, V.; VAN DER VEN, K.; PÄBLER, M.; PFEIFFER, K.; KREBS, D.; GROSSE-WILDE, H.; **Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles.** Tissue Antigens, vol. 57, pp. 15, 2001

REBMANN, V.; SWITALA, I.; EUE, I.; GROSSE-WILDE, H.; **Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy out come after ART: a German multi-center study.** Hum Reprod, vol. 25, pp. 1691-98, 2010.

RIZZO, R.; STIGNANI, M.; MELCHIORRI, L.; BARICORDI, O.R.; **Possible role of human leukocyte antigen-G molecules in human oocyte/embryo scretome.** Hum Immunol, vol. 70, pp. 970-975, 2009.

ROUSSET, F.;**Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux.** Mol. Ecol. Resources vol. 8,pp. 103-106, 2008.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; DUPONT, B.; **NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains.** Tissue Antigens, vol. 48, pp. 285-294, 1996.

SILVA, J.S.; **Região reguladora, promotora e exon 4 de HLA-G em casais com histórico de abortamento recorrente.** *Dissertação* apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 2009.

TAJIK, N.; SHAHSAVAR, F.; MOUSAVI, T.; RADJABZADEH, M.F.; **Distribution of KIR genes in the Iranian population.** Tissue Antigens, vol. 74, pp. 22-31, 2009.

TAN, C.Y.; CHONG, Y.S.; LOGANATH, A.; CHAN, Y.H.; RAVICHANDRAN, J.; LEE, C.G.; CHONG, S.S.; **Possible gene-gene interaction of KIR2DL4 with its cognate ligand HLA-G in modulating risk for preeclampsia.** Reprod Sci, vol. 16, pp. 1135-1143, 2009.

VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S; **HLA-G polymorphisms and molecule function – questions and more questions – a review.** Placenta, vol. 21, pp. 86, 2000.

VARGAS, R.G. Repertório dos genes *KIR* e polimorfismos dos genes *HLA-Cw*, *KIR2dl4* e *HLA-G* no abortamento recorrente. *Tese* apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 2009.

VARGAS RG, SARTURI PR, MATTAR SB, BOMPEIXE EP, SILVA JD, PIRRI A, BICALHO, M.G.; **Association of HLA-G alleles and 3' UTR 14-bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples.** Hum Immunol, vol. 72, pp. 479-85, 2011.

WILLIAMS, F.; MEENAGH, A.; SLEATOR, C.; MIDDLETON, D.; **Investigation of killer cell immunoglobulin like receptor gene diversity: I. KIR2DL4.** Hum Immunol, vol. 65, pp. 31-38, 2004.

WILSON, M.J.; TORKAR, M.; HAUDE, A.; MILNE, S.; JONES, T.; SHEER, D.; BECK, S.; TROWSDALE, J.; **Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families.** Proc Natl Acad Sci USA, vol. 97, pp. 4778-89, 2000.

WITT, C.S.; GOODRIDGE, J.; GERBASE-DELIMA, M.G.; DAHER, S.; CHISTIANSEN, F.T.; **Maternal KIR repertoire is not associated with recurrent spontaneous abortion.** Hum Reprod, vol. 19, pp. 2653-2657, 2004.

YAN, W.H.; LIN, A.; CHEN, B.G.; ZHOU, M.Y.; DAI, M.Z.; CHEN, X.J.; GAN, L.H.; ZHU, M.; SHI, W.W.; LI, B.L.; **Possible roles of KIR2DL4 expression on uNK cells in human pregnancy.** Am J Reprod Immunol, vol. 57, pp. 233-242, 2007.

ZHU, F.M.; JIANG, K.; LV, Q.F.; HE, J.; YAN, L.X.; **Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor KIR2DL4 diversity by sequence-based typing in Chinese population.** Tissue Antigens, vol. 67, pp. 214-221, 2006.

4. DISCUSSÃO

O importante papel da proteína HLA-G na interface materno fetal e no sucesso reprodutivo já tem sido observado em diversos estudos apresentando resultados controversos (HUNT *et al.*, 2000; HVIID *et al.*, 2003; ABBAS *et al.*, 2004; HVIID *et al.*, 2004c; NOCCI *et al.*, 2005; YAN *et al.*, 2006b; TAN *et al.*, 2008; SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2012; NARDI *et al.*, 2012). Já o gene *KIR2DL4*, classificado como um gene de matriz da família gênica KIR, está presente em quase toda a população (WILLIAMS *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2006; FLORES *et al.*, 2007; MIDDLETON *et al.*, 2005), porém, há poucos estudos de associação deste gene com o sucesso reprodutivo, como aborto (WITT *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2007; VARGAS, 2009), pré-eclampsia (LI *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2009) e fertilidade (NOWAK *et al.*, 2011).

Pela possível associação dos componentes genéticos com a dificuldade da concepção natural ou com a falha por TRA, este trabalho propôs avaliar uma possível associação entre a região promotora e codificadora do gene *HLA-G* e a região codificadora do gene *KIR2DL4* com a dificuldade de engravidar em casais submetidos a TRA, sem uma causa aparente conhecida para a infertilidade. Nossas comparações evidenciaram diferenças significativas a nível alélico, genotípico e haplotípico entre o grupo caso (pacientes submetidos a tratamento de fertilização) e o grupo controle.

O possível impacto da região reguladora 5'URR na infertilidade pode ser sugerido pela distribuição do alelo *HLA-G*010101b* significativamente mais frequente em casais inférteis do que em casais controle ($p=0,02$; $OR=2,72$; $IC=1,20-6,12$), assim como em homens inférteis do que homens controle ($p=0,01$; $OR=4,22$, $IC=1,52-11,71$), relacionando este alelo como um alelo de susceptibilidade a infertilidade, ou seja, uma maior dificuldade na concepção natural, sem relação ao sucesso reprodutivo por TRA, já que nenhuma diferença significativa foi observada considerando o resultado da TRA. Com um efeito de proteção a infertilidade, observou-se o alelo *HLA-G*010101c* mais frequente em mulheres controle do que mulheres inférteis ($p=0,03$, $OR=12,16$; $IC=0,02-1,27$). Estudo anterior descreveu haplótipos para a região promotora considerando o estudo de Castelli *et al.* 2011, o SNP na posição -964A/G, região 5'URR, e o polimorfismo Ins/Del14pb na região 3'UTR (COSTA *et*

al., 2012). Costa *et al.* sugeriram haplótipo de susceptibilidade a infertilidade com um possível efeito materno, uma vez que o haplótipo com os alelos *HLA-G*01:01:02a* e *HLA-G*01:01:02b* e a variante de ins 14-bp foi significativamente mais frequente em mulheres submetidas a tratamento de reprodução assistida comparadas a mulheres controle.

A comparação entre os SNPs do alelo *HLA-G*010101a* e do alelo *HLA-G*010101b* demonstra diferença na posição -725 (C/G), localizada próxima a uma importante região de elemento responsável pela sensibilização por interferon (ISRE -*interferon-sensitive response element*) na posição -744, sendo assim um importante sítio transcricional do gene *HLA-G* (LEFEBVRE *et al.*, 1999). Esta diferença e outras ainda não resolvidas podem alterar a força de ligação com fatores de transcrição, impactando nos níveis de *HLA-G* e, consequentemente, contribuindo para um quadro de infertilidade.

Neste sentido, as análises a nível genotípico na região promotora do gene *HLA-G* apresentaram os genótipos *HLA-G*010102a/HLA-G*010101f* ($p=0,04$; OR=2,72; IC=0,98-7,58), *HLA-G*010101b/HLA-G*010101a* ($p=0,05$; OR= 4,59; IC=1,01-20,99) e *HLA-G*010101b/HLA-G*0104a* ($p=0,03$; OR= 6,92; IC=1,24-38,52) mais frequentes entre os casais inférteis do que em casais controle. Já entre os homens a diferença encontrada foi no genótipo *HLA-G*010101b/HLA-G*0104a* ($p=0,01$; OR=13,23; IC=1,43-121,87) mais frequente nos homens do grupo caso do que em homens do grupo controle.

Comparações alélicas da região codificadora do gene *HLA-G* não apresentaram diferenças significativas, concordando com Hylenius *et al.*, 2004, e Yan *et al.*, 2006b, que não encontraram nenhuma variação alélica associada a aborto espontâneo recorrente, e Aldrich *et al.*, 2000, que não relatou nenhuma diferença significativa no quadro de pré-eclampsia em afro-americanos.

Estudos anteriores relacionando esta região a complicações da gestação demonstram resultados distintos. Na população brasileira Vargas *et al.*, 2011, observaram uma frequência maior do grupo alélico *HLA-G*01:01A* (*G*01:01:01*; *G*01:01:02*; *G*01:01:03*; *G*01:01:04*; *G*01:01:05* e *G*01:01:06*) em mulheres controle do que mulheres com relato de aborto espontâneo recorrente. Enquanto Nardi *et al.*, 2012, relatou diferença significativa entre o grupo com falha de implantação e o grupo controle, sendo o alelo *HLA-G*01:03:01* mais frequente entre os casais com falha implantacional do que os casais

controle, e em sua análise entre os sexos, o alelo *HLA-G*01:04:01* foi mais frequente entre mulheres com falha implantacional do que mulheres controle.

Outros estudos avaliando complicações da gestação e a possível associação com variantes alélicas de *HLA-G* encontraram um maior risco de aborto espontâneo recorrente com os alelos *HLA-G*01:04* e *HLA-G*01:05N* (ALDRICH *et al.*, 2001), *HLA-G*01:01:03* e *HLA-G*01:05N* (MUELLER-ECKHARDT *et al.*, 1994; PFEIFFER *et al.*, 2001), *HLA-G*01:01:03*, *HLA-G*01:01:05*, *HLA-G*01:01:08* e *HLA-G*01:05N* (ABBAS *et al.*, 2004) e uma tendência de associação com o alelo *HLA-G*01:06* (HVIID *et al.*, 2002). Outros estudos com foco na pré-eclampsia encontram um aumento na frequência do alelo *HLA-G*01:06* associado a essa complicação gestacional (MOREAU *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2008).

Genótipos da região codificadora (exon 2, 3 e 4) do gene *HLA-G* tiveram as frequências comparadas entre os casais do grupo caso e casais do grupo controle, a frequência genotípica de *HLA-G*01:01:01/HLA-G*01:05N* indicou uma significância maior em casais inférteis do que casais controle ($p=0,05$; OR=10,47; IC=1,07-102,26). Sendo o alelo *HLA-G*01:05N* descrito como um alelo baixo secretor por Rebmann *et al.*, 2001, a presença desse alelo no genótipo mais frequente nos casais submetidos a tratamento de reprodução assistida pode corroborar para a importância de uma concentração ideal da proteína na interface materno-fetal ser determinante para o sucesso reprodutivo do casal, esta diferença não foi significativamente observada nas comparações considerando o sexo, o que apóia a produção de proteína *HLA-G* na interface ser resultado da contribuição da mãe e do feto (FUZZI *et al.*, 2002; KOTZE *et al.*, 2010; REBMANN *et al.*, 2010).

Haplótipos considerando a região promotora 5'URR e codificadora do gene *HLA-G* foram inferidos e as comparações das frequências haplotípicas demonstraram o haplótipo *HLA-G*010101b/HLA-G*01:01:01* significativamente mais frequente nos casais inférteis do que nos casais controle ($p=0,04$; OR=2,57; IC=1,04-6,36), esta frequência também indicou frequência significativamente maior em homens inférteis do que homens controle ($p=0,03$; OR=3,81; IC=1,19-12,22). A composição do haplótipo com o alelo da região promotora *HLA-G*010101b* sugestivo de uma maior susceptibilidade a infertilidade, uma maior dificuldade de concepção e o alelo da região codificadora associado, por Rebmann *et al.*, 2001, a altos níveis séricos de sHLA-G, cria a hipótese de que uma região de pouca expressão pode ser determinante na codificação insuficiente da proteína para o sucesso no processo gestacional.

Nossos resultados demonstram uma diferença na frequência alélica entre casais caso e casais controle para os alelos *KIR2DL4*00102*, menos frequente em casais caso do que em casais controle ($p=0,05$; $OR=1,57$; $IC=0,36-1,08$) e dentre os casais com dificuldade de engravidar este alelo indicou maior frequência entre os que obtiveram sucesso na TRA do que os casais com insucesso no tratamento ($p=0,01$; $OR=3,52$; $CI=1,20-10,27$). Conforme descrito por Goodridge e cols., 2003, um importante polimorfismo no códon 248 do exon 7 do gene *KIR2DL4* é determinante para que o transcrito traduza um receptor com expressão na membrana ou no interior da célula uNK, pelo alelo *KIR2DL4*00102* apresentar uma A na primeira base deste códon, sugere-se um importante papel da presença do receptor na membrana da célula uNK na interface materno fetal para o sucesso reprodutivo. O alelo *KIR2DL4*011* apresentou-se significativamente mais frequente em casais do grupo caso do que casais do grupo controle ($p=0,02$; $OR=1,57$; $CI=0,97-2,55$), este alelo apresenta no polimorfismo do códon 248 do exon 7 uma deleção da primeira base, demonstrando que o receptor apresentado no interior da membrana pode não ser tão eficaz na ligação com sua proteína ligante HLA-G. As comparações entre homens caso e homens controle não foram consideradas, uma vez que a interação na interface materno-fetal ocorre entre as moléculas de HLA-G, produzidas pelo organismo materno e fetal (Fuzzi *et al.*, 2002; Kotze *et al.*, 2010; Rebmann *et al.*, 2010) e as células NK maternas para a reorganização tecidual local a fim de suprir as necessidades nutricionais e fisiológicas do feto.

As comparações das frequências genótípicas demonstraram uma associação do genótipo *KIR2DL4*00102/KIR2DL4*00801* sendo mais frequente em casais do grupo controle do que casais do grupo caso ($p=0,05$; $OR=0,28$; $IC=0,06-1,24$), este genótipo combina um alelo que possui uma A no códon 248 do exon 7, totalizando uma repetição de 10A, e um alelo com a deleção da A nesta posição, totalizando 9A, avaliando a expressão do receptor traduzido do transcrito pode-se sugerir que há expressão suficiente deste na membrana da célula uNK na interface materno-fetal, resultando em uma ligação suficiente com a proteína ligante HLA-G e assim sendo associado com uma menor dificuldade gestacional, resultando na fertilidade do casal.

Outros estudos de associação do gene *KIR2DL4* e variáveis gestacionais já publicados apresentam resultados diversos. Witt *et al.*, 2004 não detectaram nenhuma diferença entre mulheres com histórico de aborto recorrente e mulheres controle, similar aos resultados de Vargas e cols., em 2009 (dados não publicados). Por outro lado, o grupo de

Yan, 2007, demonstrou uma maior frequência da deleção no exon 7 (9A) em mulheres com aborto recorrente do que em mulheres controle. Neste estudo, agrupou-se os alelos contendo 10A, ou seja, uma A na primeira base do códon 248 do exon 7 como grupo 1 (*KIR2DL4*00102*, *KIR2DL4*00103*, *KIR2DL4*00501* e *KIR2DL4*006*) e os alelos com 9A, ou seja, uma deleção no códon 248 do exon 7 como grupo 2 (*KIR2DL4*00801*, *KIR2DL4*00802* e *KIR2DL4*011*) e comparações em todos os níveis foram realizadas, apresentando significância uma maior frequência do grupo 2 no grupo de casais caso do que no grupo controle ($p=0,02$; $OR=1,46$; $IC=1,03-2,08$) concordando com os achados de Yan e cols., 2007, este resultado sugere que a presença do receptor no interior da célula uNK pode dificultar a ligação da proteína HLA-G e ser prejudicial ao sucesso reprodutivo. Nas comparações genotípicas o genótipo grupo 1/grupo 1 apresentou-se significativamente mais frequente em casais do grupo controle do que casais caso ($p=0,03$; $OR=0,51$; $IC=0,25-1,00$), reforçando a evidência de que a apresentação do receptor na membrana da célula uNK pode ser essencial para o sucesso reprodutivo.

Estudos de associação do gene *KIR2DL4* com o desenvolvimento de pré-eclampsia corroboram com nossos resultados, conforme demonstrado por Li *et al.*, 2008, onde a menor expressão do receptor *KIR2DL4* foi associado com os casos de pré-eclampsia. Enquanto Tan *et al.*, 2009 estudaram a combinação do HLA-G e do *KIR2DL4* com casos de pré-eclampsia, associando a combinação alélica *HLA-G*01:06* com *KIR2DL4*006* com a patologia.

Análises haplotípicas foram realizadas para investigar uma possível interação haplotípica entre a região 5'URR do gene *HLA-G*, a sua região codificante (exon 2, 3 e 4) e a região codificante do gene *KIR2DL4*, que codifica um importante receptor da proteína HLA-G. As comparações das frequências haplotípicas entre casais caso e casais controle demonstraram uma maior frequência do haplótipo 3 nos casais controle do que nos casais caso ($p=0,05$; $OR=0,28$; $IC=0,06-1,23$). A comparação das frequências haplotípicas considerando o resultado da ART demonstrou uma maior frequência do haplótipo 5 em mulheres com sucesso no tratamento do que em mulheres com insucesso ($p=0,04$; $OR=6,85$; $IC=0,75-62,06$). Análise de haplótipo considerando região promotora e codificante do gene *HLA-G* e da região codificante do gene *KIR2DL4* não foi relatada anteriormente na literatura.

O haplótipo 3 mais frequente em casais controle do que casais caso é composto pelos alelos *HLA-G*010101a/HLA-G*01:01:01/KIR2DL4*00102*, conforme análise isolada dos alelos percebe-se que o alelo da região promotora, *HLA-G*010101a*, foi relacionado com uma maior expressão gênica (LARSEN e HVIID, 2009; CASTELLI *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012), enquanto o alelo descrito na região codificante do gene *HLA-G*, *HLA-G*01:01:01*, está relacionado com altos níveis de proteína HLA-G (REBMANN *et al.*, 2001) e em estudo relacionando com AER este alelo foi significativamente mais frequente no grupo controle do que no grupo AER (VARGAS *et al.*, 2011). O alelo deste haplótipo no gene *KIR2DL4*, *KIR2DL4*00102*, apresenta 10A no exon 7, sendo este associado com maiores quantidades do receptor KIR2DL4 na membrana de uNK (GOODRIGDE *et al.*, 2003). Logo, a maior frequência deste haplótipo em casais controle sugere que altas concentrações de proteína HLA-G e as altas concentrações do receptor KIR2DL4 na membrana das células uNK são determinantes no sucesso reprodutivo.

O haplótipo 5 é constituído pelos alelos *HLA-G*010102a/HLA-G*01:01:02/KIR2DL4*00501*. O alelo *HLA-G*010102a* na região promotora já relacionado como haplótipo de baixa expressão do gene *HLA-G* por Costa *et al.*, 2012, enquanto o alelo *HLA-G*01:01:02* associado a altos níveis séricos de HLA-G solúvel (sHLA-G). O alelo *KIR*00501* não possui a deleção no exon 7, apresentando a repetição com 10A, sendo relacionado com níveis normais de receptores na membrana das uNK (GOODRIGDE *et al.*, 2003). Assim, a frequência maior deste haplótipo em mulheres com sucesso no tratamento do que em mulheres com insucesso, pode sugerir que um cenário com a baixa expressão do gene *HLA-G* e, conseqüentemente, baixos níveis da proteína HLA-G pode ser compensado por uma maior expressão de receptores KIR2DL4 resultando no sucesso reprodutivo.

Na busca pela melhor compreensão da combinação entre os pais e o sucesso reprodutivo, comparamos o genótipo de *HLA-G* em cada casal, a combinação do genótipo materno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:03* e genótipo paterno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01* foi apresentada com exclusividade pelo grupo de casais controle, tendo diferença significativa nesta distribuição ($p=0.02$; $OR=0.20$; $CI=0.02-1.57$). Esta combinação de genótipos de alelo de alta expressão de níveis de proteína HLA-G (*HLA-G*01:01*) e um alelo de baixa expressão protéica (*HLA-G*01:03*) da mãe e alelo de alta expressão (*HLA-G*01:01*) do pai sugere que há uma produção protéica satisfatória na interface materno fetal, independente do genótipo

KIR2DL4 portado pela mãe, uma vez que as comparações considerando este genótipo não apresentou nenhuma diferença significativa.

Com os genótipos combinados do casal, foi possível inferir os possíveis genótipos F1 destes casais. Nesta comparação entre genótipos F1 inferidos a partir dos genótipos parentais, o genótipo *HLA-G*01:01/HLA-G*01:03* demonstrou-se significativamente mais frequente em filhos dos casais controle do que os filhos dos casais caso ($p=0.03$; $OR=0.49$; $CI=0.23-1.01$), enquanto o genótipo *HLA-G*01:01/HLA-G*01:05N* apresentou maior frequência nos filhos dos casais caso do que nos filhos dos casais controle ($p=0.03$; $OR=10.65$; $CI=1.10-103.21$), sugerindo assim que a expressão de HLA-G para o sucesso implantacional não é unilateral e sim determinado tanto pela mãe como pelo feto, conforme já havia sido sugerido pela dosagem de sHLA-G no sobrenadante da cultura de embriões (Fuzzi et al., 2002; Kotze et al., 2010; Rebmann et al., 2010).

Em conclusão, sendo a gestação um estado fisiológico multifatorial, que sofre a influência de fatores genéticos e ambientais, há dificuldade em alcançar um consenso sobre o real papel do *HLA-G* na gestação e sobre a influência dos diferentes alelos no curso de uma gestação. Neste estudo podemos sugerir que a combinação de variantes que envolvem a região do promotor e a região de codificação (exon 2, 3 e 4) do *HLA-G* poderia ser essencial para a determinação de níveis adequados de expressão de gene e assim o sucesso gestacional do par. O gene *KIR2DL4* também se indicou determinante para a fertilidade do casal quando associado aos alelos *HLA-G*. A alta expressão gênica de *HLA-G* e altos níveis séricos com alelos *KIR2DL4* que apresentam a deleção de base no exon 7 indicam resposta decorrente da interação compensatória entre ambos produtos protéicos. Assim sendo, identificar diferenças entre os alelos regulatórios de *HLA-G* e alelos codificantes de *KIR2DL4* não só pode permitir e melhorar a compreensão da biologia da gravidez, mas também pode ajudar a desvendar as insuficiências imunogenéticas associadas à infertilidade e potencialmente fornecendo alvo para tratamentos adicionais e dando respostas para auxiliar casais, principalmente se os resultados da investigação sejam traduzidos corretamente na prática clínica.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Neste estudo observou-se que a composição gênica característica do Haplótipo 3, que combina alelos de *HLA-G*, geralmente associados com altos níveis séricos da proteína HLA-G, com alelos *KIR2DL4*, que apresentam a base A no exon 7 e alta expressão na membrana das uNK, estaria associada ao sucesso reprodutivo, seja considerada de proteção a infertilidade e portanto, o haplótipo 3 estaria associado ao sucesso reprodutivo.

- Nenhum alelo novo foi descrito na população estudada para o gene *HLA-G*, nem para o gene *KIR2DL4*.

- Dentre as frequências alélicas 5'URR do gene *HLA-G*, a frequência do alelo *HLA-G*010101b* foi significativamente maior nos casais inférteis do que nos casais controle ($p=0,02$; $OR=2,72$; $IC= 1,20-6,12$) e, apresentou maior frequência em homens inférteis do que homens controle ($p=0,01$; $OR=4,22$; $IC=1,52-11,71$), sugerindo ser o mesmo um alelo de susceptibilidade a infertilidade e dificuldades na concepção; já o alelo *HLA-G*010101c* apresentou-se mais frequente em mulheres controle do que em mulheres caso ($p=0,03$; $OR=0,16$; $IC=0,02-1,27$) e podendo conferir proteção a infertilidade, ou seja, maior fertilidade.

- No conjunto de genótipos relacionados a 5'URR do gene *HLA-G* pode-se observar que o alelo ***HLA-G*010101b*** está presente em 2 genótipos mais frequentemente observados nos grupos de casais inférteis e entre homens inférteis: *HLA-G*010102a/HLA-G*010101f*, *HLA-G*010101b/HLA-G*010101a* e *HLA-G*010101b/HLA-G*0104a* ($p=0,04$; $OR=2,72$; $IC=0,98-7,58$; $p=0,05$; $OR= 4,59$; $IC=1,01-20,99$; $p=0,03$; $OR= 6,92$; $IC=1,24-38,52$, respectivamente); e o genótipo *HLA-G*010101b/HLA-G*0104a* mais frequente em homens inférteis do que os homens controle ($p=0,01$; $OR=13,23$; $IC=1,43-121,87$).

- Nenhum alelo da região codificante do gene *HLA-G* apresentou diferença significativa nas diferentes comparações.

- Dentre os genótipos da região codificadora do gene *HLA-G* comparados entre casais caso e casais controle a frequência genotípica de *HLA-G*01:01:01/HLA-G*01:05N*

mostrou-se significativamente maior em casais inférteis do que casais controle ($p=0,05$; $OR=10,47$; $IC=1,07-102,26$).

- Foram inferidos 13 haplótipos combinando-se a região promotora 5'URR e região codificante do gene *HLA-G*. Todos foram observados em ambos os grupos; a comparação entre os casais caso e casais controle revelou que o haplótipo ***HLA-G*010101b/HLA-G*01:01:01*** significativamente mais frequente nos casais inférteis do que nos casais controle ($p=0,04$; $OR=2,57$; $IC=1,04-6,36$), esta frequência também se apresentou significativamente maior em homens inférteis do que homens controle ($p=0,03$; $OR=3,81$; $IC=1,19-12,22$), sugerindo associação desse genótipo com infertilidade.

- O alelo *KIR2DL4*00102* mostrou-se menos frequente em casais inférteis do que em casais controle ($p=0,05$; $OR=1,57$; $IC=0,36-1,08$) e mais frequente entre os casais com sucesso na TRA do que os com insucesso ($p=0,01$; $OR=3,52$; $IC=1,20-10,27$) reforçando uma possível associação do mesmo com a gestação bem sucedida, enquanto o alelo *KIR2DL4*011* apresentou um papel inverso, sendo mais frequente em casais inférteis do que em casais controle ($p=0,02$; $OR=1,57$; $IC=0,97-2,55$), podendo ser associado com uma maior dificuldade de reprodução; a maior frequência do grupo alélico 2 (9A no exon 7) nos casais inférteis do que nos casais controle ($p=0,02$; $OR=1,46$; $IC=1,03-2,08$) reitera que a ausência do receptor na membrana da célula uNK pode dificultar a interação com a proteína HLA-G ligante.

- O genótipo *KIR*00102/KIR*00801* pode ser associado com uma expressão positiva do receptor na membrana da célula uNK, enfatizando a importância da presença do receptor na membrana para a correta ligação com a proteína HLA-G na interface materno fetal.

- Haplótipos combinando os genes *HLA-G* e *KIR2DL4* (receptor e ligante) foram inferidos, sendo que dos 19 haplótipos descritos 2 foram encontrados apenas no grupo controle (Haplótipo 18 e Haplótipo 19); o Haplótipo 3 foi mais frequente nos casais controle do que nos casais inférteis ($p=0,05$; $OR=0,28$; $IC=0,06-1,23$), já o Haplótipo 5 mais frequente em mulheres com sucesso no tratamento do que em mulheres com insucesso ($p=0,04$; $OR=6,85$; $IC=0,75-62,06$), estas diferenças haplotípicas demonstram que a combinação entre receptor e ligante pode ser fundamental para o bom prognóstico reprodutivo.

- A combinação dos genótipos materno e paterno pode ser determinante no sucesso reprodutivo, como observado pela exclusividade do genótipo materno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:03* e genótipo paterno *HLA-G*01:01/HLA-G*01:01* no grupo de casais controle, com diferença significativa ($p=0.02$; $OR=0.20$; $CI=0.02-1.57$), sendo a combinação de um genótipo materno associando alelos de altos e baixos níveis de HLA-G com um genótipo paterno de alelos de alta expressão, sugerindo uma contribuição do feto na expressão protéica necessária para o sucesso da implantação.

- A maior frequência do genótipo *HLA-G*01:01/HLA-G*01:03* em F1 de casais controles do que em F1 de casais inférteis ($p=0.03$; $OR=0.49$; $CI=0.23-1.01$) e a distribuição inversa do genótipo *HLA-G*01:01/HLA-G*01:05N*, ou seja, mais frequente em filhos dos casais inférteis do que em filhos dos casais controle ($p=0.03$; $OR=10.65$; $CI=1.10-103.21$) sugere que a expressão de proteína HLA-G pelo feto contribui para a fertilidade do casal.

- No presente estudo, evidências foram sugestivas sobre a influência dos genes *KIR2DL4* e *HLA-G* na fertilidade do casal e também no sucesso implantacional observado após ART. No entanto, ficou também evidente que não apenas os genótipos parentais podem ser determinantes da interação KIR-ligante (HLA-G) presentes na interface materno-fetal, mas também o genótipo do embrião poderia influenciar no estabelecimento de uma etapa implantacional bem sucedida, que não é unilateralmente determinada pelo genótipo materno, mas também determinada pelo feto, conforme reportado em estudos anteriores relacionados ao sucesso gestacional.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; TRIPATHI, P.; NAIK, S.; AGRAWAL, S.; **Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions.** Eur J Immunogenetics, vol. 31, pp. 275, 2004.

ABBAS, A.; JAVED, S.; AGRAWAL, S.; **Transcription status of HLA-G at the maternal – fetal interface in recurrent spontaneous abortion.** Int J Gynecol Obst, vol. 93, pp. 148, 2006.

ASHKAR, A.A.; CROY, B.A.; **Functions of uterine natural killers cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy.** Semin Immunol, vol. 13, pp. 235-241, 2001.

ASHWORTH, L.K.; BATZER, M.A.; BRANDRIFF, B.; BRANSCOMB, E.; DE JONG, P.; GARCIA, E.; GARNES, J.A.; LAMERDIN, J.E.; LENNON, G.; **An integrated metric physical map of human chromosome 19.** Nat Genet, vol. 11, pp. 422-427, 1995.

ASLAN, D.; ELIZUR, S.E.; LEVRON, J.; SHULMAN, A.; LERNER-GEVA, L.; BIDER, D.; DOR, J.; **Comparison of zygote intrafallopian tube transfer in patients with repeated implantation failure.** Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, vol. 122, pp. 191-194, 2005.

BENSNDORP, A.J.; COHLEN, B.J.; HEINEMAN, M.J.; VANDEKERCKHOVE, P.; **Intra-uterine insemination for male subfertility.** Cochrane Database Syst Rev, vol.18, pp. CD000360, 2007.

BENSUSSAN, A.; MANSUR, I.G.; MALLET, V.; RODRIGUES, A.M.; GURR, M.; WEISS, E.H.; BREM, G.; BPUMSELL, L.; GLUCKMAN, E.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; LEBOUTEILLER, P.; **Detection of membrane-bound HLA-G translated products with a specific monoclonal antibody.** Proc Natl Acad Sci USA, vol. 92, pp. 10292, 1995.

BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C.; **The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens.** Nature, vol. 329, pp. 512, 1987.

BLAKE D.; FARGUHAR, C.M.; JOHNSON, N.; PROCTOR, M.; **Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception.** Cochrane Database Syst Rev, vol. 4, pp. CD002118, 2007.

BLANCHET, O.; BOURGE, J.F.; ZINSZER, H.; ISRAEL, A.; KOURILSKY, P.; DAUSSET, J.; DEGOS, L.; PAUL, P.; **Altered binding of regulatory factors to HLA class I enhancer sequence in human tumor cell lines lacking class I antigen expression.** Proc Natl Acad Sci USA, vol 89, pp. 3488, 1992.

BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G.; **Multiple significance tests: The Bonferroni method.** BMJ, vol. 310, pp. 170, 1995.

BLASCHITZ, A.; JUCH, H.; VOLZ, A.; HUTTER, H.; DAXBOECK, C.; DESOYE, G.; DOHR, G.; **The soluble pool of HLA-G produced by human trophoblasts does not include detectable levels of the intron 4-containing HLA-G5 and HLA-G6 isoforms.** Mol Hum Reprod, vol. 11, pp. 699, 2005

BOHJANEN, P.R.; PETRYNIAK, B.; JUNE, C.H.; THOMPSON, C.B.; LINDSTEN, T.; **An inducible cytoplasmic factor (AU-B) binds selectively to AUUUA multimers in the 3'utr of lymphokine mRNA.** Mol Cell Biol, vol. 11, pp. 3288, 1991.

BOOMSMA CM, HEINEMAN MJ, COHLEN BJ, FARQUHAR C. **Semen preparation techniques for intrauterine insemination (Review).** Cochrane Database Syst Rev, Art No.: CD004507, doi:10.1002/14651858,CD004507.pub3, 2007.

BORGATTI, M.; RIZZO, R.; DAL CANTO, M.B.; FUMAGALLI, D.; RENZINI, M.M.; FADINI, R.; STIGNANI, M.; BARICORDI, O.R.; GAMBARI, R.; **Release of sICAM-1 in oocytes and *in vitro* fertilized human embryos.** Plos One, vol. 3, pp. e3970, 2008.

BOSS, J.M.; **Regulation of transcription of MHC class II genes.** Curr Opin Immunol, vol. 9, pp. 107, 1997.

BRONSON, R.A.; **Sperm antibodies.** Immunol Allerg Clin North Am, vol. 10, pp. 165-184, 1990.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JÚNIOR, C.T.; DONADI, E.A.; **HLA-G alleles and HLA-G 14bp polymorphisms in a Brazilian population.** Tissue Antigens, vol. 70, pp. 62-8, 2007.

CASTELLI, E.C.; MOREAU, P.; OYA E CHIROMATZO, A.; MENDES-JÚNIOR, C.T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; YAGHI, L.; GIULIATTI, S.; CAROSELLA, E.D.; DONADI, E.A.; **In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes.** Hum Immunol, 2009, doi: 10.1016/j.humimm.2009.07.028.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; ROGER, M.; MOREAU, P.; DONADI, E.A.; **A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution.** Mol Biol Evol, vol.28, pp. 3069-86, 2011.

CERWENKA, A.; O'CALLAGHAN, C.A.; AJYI, W.; ROOPENIAN, D.C.; JOYCE, S.; LANIER, L.L.; **Cutting edge: the minor histocompatibility antigen H60 peptide interacts with both H-2Kb and NKG2D.** J Immunol, vol. 168, pp. 3131-34, 2002.

CHEN, X.Y.; YAN, W.H.; LIN, A.; XU, H.H.; ZHANG, J.G.; WANG, X.X.; **The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma.** Tissue Antigens, vol. 72, pp. 335, 2008.

CHUA, J.H.; ARGUGAM, A.; JEYASEELAN, K.; **MicroRNAs: biogenesis, function and applications.** Curr Opin Mol Ther, vol. 11, n. 2, pp. 189, 2009.

CONTRERAS, G.; ALÁEZ, C.; MURGUÍA, A.; GARCÍA, D.; FLORES, H.; GORODEZKY, C.; **Distribution of the killer cell immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos.** Tissue Antigens, vol. 69, pp. 125-129, 2007.

COSTA, C.H.; GELMINI, G.F.; WOWK, P.F.; MATTAR, S.B.; VARGAS, R.G.; ROXO, V.M.; SCHUFFNER, A.; BICALHO, M. da G.; **HLA-G r3regulatory haplotypes and implantation outcome in couples who underwent assisted reproduction treatment.** Hum Immunol, vol. 73, pp. 891-897, 2012.

COSTA, C.H.; GELMINI, G.F.; NARDI, F.S.; ROXO, V.M.; SCHUFFNER, A.; BICALHO, M.G.; **HLA-G profile of infertile couples who underwent assisted reproduction treatment.** Hum Immunol, vol. 77, pp. 1179-1186, 2016.

DIEHL, M.; MÜNZ, C.; KEILHOLZ, W.; STEVANOVIC, S.; HOLMES, N.; LOKE, Y.W.; RAMMENSEE, H.G.; **Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters.** Curr Biol, vol. 6, pp. 305, 1996.

DENIS, L.; GAGNE, K.; GUEGLIO, B.; KERDUDOU, N.; MILPIED, N.; SIMON, P.; FOLLEA, G.; BONNEVILLE, M.; HAROUSSEAU, J.L.; BIGNON, J.D.; **NK-KIR transcript kinetics correlate with acute graft-versus-host disease occurrence after allogeneic bone marrow transplantation.** Hum Immunol, vol. 66, pp. 447-459, 2005.

DIEFENBACH, A.; JAMIESON, A.M.; LIU, S.D.; SHASTRI, N.; RAULET, D.H.; **Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages.** Nat Immunol, vol. 1, pp. 119-126, 2000.

EBMT disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>, acesso em: outubro 2015.

ELLIS, S.A.; SARGENT, I.L.; REDMAN, W.G.; MCMICHAEL, A.J.; **Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line.** Immunology, vol. 59, pp. 595, 1986.

ELLIS, S.A.; PALMER, M.S.; MCMICHAEL, A.J.; **Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule.** J Immunol, vol. 144, pp. 731, 1990.

ENSEMBLE, disponível em <http://www.ensembl.org/index.html>, acessado em outubro 2015.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S.; **Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis.** Evolutionary Bioinformatics Online vol. 1, pp. 47-50.

EWERTON, P.D.; LEITE, M. DE M.; MAGALHÃES, M.; SENA, L.; MELO DOS SANTOS, E.J.; **Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles.** Immunogenetics, vol. 59, pp. 625-630, 2007.

FANCHIN, R.; GALLOT, V.; ROUAS-FREISS, N.; FRYDMAN, R.; CAROSELLA, E.D.; **Implication of HLA-G in human embryo implantation.** Hum Immun, vol. 68, pp. 259-63, 2007.

FLORES, A.C.; MARCOS, C.Y.; PALADINO, N.; CAPUCCHIO, M.; THEILER, G.; ARRUVITO, L.; PARDO, R.; HABEGGER, A.; WILLIAMS, F.; MIDDLETON, D.; FAINBOIM, L.; **KIR genes polymorphism in Argentinean Caucasoid and Amerindian populations.** Tissue Antigens, vol. 69, pp. 568-576, 2007.

FUZZI, B.; RIZZO, R.; CRISCUOLI, L.; NOCI, I.; MELCHIORRI, L.; SCARSELLI, B.; BENCINI, E.; MENICUCCI, A.; BARICORDI, O.R.; **HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy.** Eur J Immunogenetics, vol. 32, pp. 311, 2002.

GAO, G.F.; TORMO, J.; GERTH, U.C.; WYER, J.R.; MCMICHAEL, A.J.; STUART, D.I.; BELL, J.I.; JONES, Y.E.; JAKOBSEN, B.K.; **Crystal structure of the complex between human CD8 α - α and HLA-A2.** Nature, vol. 387, pp. 630, 1997.

GENDZEKHADZE, K.; NORMAN, P.J.; ABI-RACHED, L.; LAYRISSE, Z.; PARHAM, P.; **High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes.** Brief Communication, vol. 58, pp. 474-480, 2006

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T.; **A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment.** Proc Nat Acad Sci USA, vol. 84, pp. 9145, 1987.

GOBIN, S.J.P.; PEIJNENBURG, A.; KEIJSERS, V.; VAN DER ELSEN, P.; **Site is a crucial for two routes of IFN γ -induced MHC class I transactivation: The ISRE-mediate route and a novel pathway involving CIITA.** Immunity, vol. 6, pp. 601, 1997a.

GOBIN, S.J.P.; KEIJSERS, V.; WOLTMAN, A.M.; PEIJNENBURG, A.; WILSON, L.; VAN DEN ELSEN, P.J.; **Locus-specific regulation of HLA class I gene expression.** In.: D. Charron (ed): Genetic diversity of HLA. Func Med Implic vol. 2, pp. 295, 1997b.

GOBIN, S.J.P.; PEIJNENBURG, A.; VAN EGGERMOND, M.; VAN ZUTPLHEN, M.; VAN DEN BERG, R.; VAN DEN ELSEN, P.J.; **The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA mediated transactivation of MHC class I and β_2m genes.** Immunity, vol. 9, pp. 531, 1998.

GOES, N.; SIMS, T.; URMSON, J.; VINCENT, D.; RAMASSAR, V.; HALLORAN, P.F.; **Disturbed MHC regulation in de INF- γ knockout mouse. Evidence for three states of MHC expression with distinct roles for INF- γ .** J Immunol, vol. 155, pp. 4559, 1995.

GOLDBERG, J.M.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; **In vitro fertilization update.** Cleveland Clinic J Med, vol. 74, pp. 329-38, 2007.

GOMEZ-LOZANO N, Gardiner CM, Parham P, Vilches C. **Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B.** Immunogenetics, vol. 54, pp. 314-9, 2002.

GOODRIGDE, J.P.; WITT, C.S.; CHRISTIANSEN, F.T.; WARREN, H.S.; **KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cell.** J Immunol, vol. 171, pp. 1768-74, 2003.

GORIS, A.; DOBOSI, R.; BOONEN, S.; NAGELS, G.; DUBOIS, B.; **KIR2DL4 (CD158d) polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis.** J Neuroimmunol, vol. 210, pp. 113-115, 2009.

GUHA, P.; BHATTACHARIEE, S.; CHAUDHURI, T.K.; **Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Bengali population of northern West Bengal, India.** Scand J Immunol, vol. 80, pp. 441-451, 2014.

HARRISON, G.A.; HUMPHREY, K.E.; JAKOBSEN, I.B.; COOPER, D.W.; **A 14bp deletion polymorphism in the HLA-G gene.** Hum Mol Genet, vol. 2, pp. 2200, 1993.

HLA nomenclature, disponível em: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>, acessado em outubro 2015.

HOBART, M.; RAMASSAR, V.; GOES, N.; URMSON, J.; HALLORAN, P.F.; **INF regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes *in vivo*.** J Immunol, vol. 158, pp. 4260, 1997.

HSU, K.C.; CHIDA, S.; GERAGHTY, D.E.; DUPONT, B.; **The killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism.** Immunol Rev, vol. 190, pp. 40-52, 2002.

HUNT, J.S.; JADHAV, L.; CHU, W.; GERAGHTY, D.E.; OBER, C. **Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy.** Am J Obstet Gynecol, v. 183, pp. 682, 2000.

HUNTER, H.; HAMMER, A.; DOHR, G.; HUNT, J.S.; **HLA expression at the maternal-fetal interface.** Dev Immunol, vol. 6, pp. 197-204, 1998.

HVIID, T.V.; SORENSEN, S.; MORLING, N.; **Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases 5' to the start site of transcription, the promoter region, and exon 1 of the HLA-G gene.** Hum Immunol, vol. 60, pp. 1237, 1999.

HVIID, T.V.; HYLENIUS, S.; HOEGH, A.M.; KRUSE, C.; CHRISTIANSEN, O.B.; **HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions.** Tissue Antigens, vol. 60, pp. 122, 2002.

HVIID, T.V.; HYLENIUS, S.; RORBYE, C.; NIELSEN, L.G.; **HLA-G variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels.** Immunogenetics, vol. 55, pp. 63, 2003.

HVIID, T.V.F.; HYLENIUS, S.; LINDHARD, A.; CHRISTIANSEN, O.B.; **Association between human leukocyte antigen-G and success of *in vitro* fertilization and pregnancy outcome.** Tissue Antigens, vol. 64, pp. 66, 2004a.

HVIID, T.V.; **HLA-G genotype is associated with fetoplacental growth.** Hum. Immun, vol. 65, pp.586, 2004b.

HVIID, T.V.; RIZZO, R.; CHRISTIANSEN, O.B.; MELCHIORRI, L.; LINDHARD, A.; BARICORDI, O.R.; **HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms.** Immunogenetics, vol. 56, pp. 135, 2004c.

HVIID, T.V.F.; CHRISTIANSEN, O.B.; **Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G – Possible implications for human reproduction and autoimmune disease.** Hum Immunol, vol. 66, pp. 688, 2005.

HVIID, T.V.F.; **HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications.** Hum Reprod Up, vol. 12, pp. 209, 2006a.

HVIID, T.V.F.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; STIGNANI, M.; BARICORDI, O.R. **Polymorphism in the 5'upstream regulatory and 3'unstrated region of the HLA-G in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression.** Hum Immunol, v. 67, p. 53, 2006b.

HYLENIUS, S.; ANDERSEN, A.M.; MELBYE, M.; HVIID, T.V.; **Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads.** Mol. Hum Reprod, vol. 10, pp. 237, 2004.

IMBRAIM, E.C.; MORANGE, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P.; **Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines.** Cell Stress & Chaperones, vol. 5, pp. 207-218, 2000.

IMGT/HLA *Database* , disponível em <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>, acessado em outubro de 2015.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; LEE, N.; DOROFEEVA, N.; HATAKE, K.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E.; **Protein expression and peptide binding suggest**

unique and interacting functions roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. J Immunol, vol. 171, pp. 1376, 2003.

IVERSEN, A.C.; NGUYEN, O.T.D.; TOMMERDAL, L.F.; EIDE, I.P.; LANDSEM, V.M.; ACAR, N.; MYHRE, R.; KLUNGLAND, H.; AUSTGULEN, R.; **The HLA-G 14bp gene polymorphism and decidual HLA-G 14bp gene expression in pre-eclamptic and normal pregnancies.** J Reprod Immunol, vol. 78, pp. 158, 2008.

JIANG, K.; ZHU, F.M.; LV, Q.F.; YAN, L.X.; **Distribution killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population.** Tissue Antigens, vol. 65, pp. 556–563, 2005.

JURISICOVA, A.; CASPER, R.F.; MACLUSKY, N.J.; MILLS, G.B.; LIBRACH, C.L.; **HLA-G expression during preimplantation human embryo development.** Proc Nat Acad Sci USA, vol. 93, pp. 161, 1996.

KAHN, J.A.; VON DURING, V.; SUNDE, A.; SORDAL, T.; MOLNE, K.; **Fallopian tube sperm perfusion: first clinical experience.** Hum Reprod, vol. 7, pp. 19-24, 1992.

KARRE, K.; LJUNGGREN, H.G.; PIONTEK, G.; KIESSLING, R.; **Selective rejection of H-2-deficiente lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy.** Nature, vol. 319, pp. 675-8, 1986.

KENNEDY, S.; BERGQVIST, A.; CHAPRON, C.; D’HOOGHE, T.; DUNSELMAN, G.; GREB, R.; HUMMELSHOJ, L.; PRENTICE, A.; SARIDOGAN, E.; **ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis.** Hum Reprod, vol. 20, pp. 2698-2704, 2005.

KIKUCHI-MAKI, A.; YUSA, S.; CAINA, T.L.; CAMPBELL, K.S.; **KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production.** J Immunol, vol. 171, pp. 3415-3425, 2003.

KING, A.; BIRKBY, C.; LOKE, Y.W.; **Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast.** Cell Immunol, vol. 118, pp. 337-4415, 1989.

KING, A.; BALENDRAN, N.; WOODING, P.; CARTER, N.P.; LOKE, Y.W.; **CD3-leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56⁺⁺ population.** Dev Immunol, vol. 1, pp. 169-90, 1991.

KING, A.; WOODING, P.; GARDNER, L.; LOKE, Y.W.; **Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by human uterine CD56⁺ NK cells implies they are activated and capable of effector functions.** Hum Reprod, vol. 8, pp. 979-83, 1993.

KING, A.; BURROWS, T.; LOKE, Y.W.; **Human uterine natural killer cells.** Nat Immunity, vol. 15, pp. 41, 1996.

KHAKOO, S. I.; CARRINGTON, M.; **KIR and disease: a model system or system of models?** Immunol Rev, vol. 214, pp. 186-201, 2006.

KOOPMAN, L.A.; KOPCOW, H.D.; RYBALOW, B.; BOYSON, J.E.; ORANGE, J.S.; SCHATZ, F.; MASCH, R.; LOCKWOOD, C.J.; SCHACHTER, A.D.; PARK, P.J.; STROMINGER, J.L.; **Human decidual natural killer cells are a unique NK subset with immunomodulatory potential.** J Exp Med, vol. 198, pp. 1201-12, 2003.

KOPCOW, H.D.; ALLAN, D.S.; CHEN, X.; RYBALOV, B.; ANDZELM, M.M.; GE, B.; STROMINGER, J.L.; **Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic.** Proc Natl Acad Sci USA, vol. 102, pp. 15563-8, 2005.

KOTZE, D.J.; HANSEN, P.; KESKINTEPE, L.; SNOWDEN, E.; SHER, G.; KRUGER, T.; **Embryo selection criteria based on morphology VERSUS the expression of a biochemical marker (sHLA-G) and a graduated embryo score: prediction of pregnancy outcome.** J Assit Reprod Genet, vol. 27, pp. 309-16, 2010.

KOVATS, S.; MAIN, E.K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S.J.; DEMARS, R.; **A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblast.** Science, vol. 248, pp. 220, 1990.

KULIEV, A.; VERLINSKY, Y.; **Preimplantation genetic diagnosis: technological advances to improve accuracy and range of applications.** Reprod Biomed Online, vol. 16, pp. 532-538, 2008.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I.; **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** Nucleic Acid Res, vol. 19, pp. 5444, 1991.

LARSEN, M.H.; HVIID, T.V.; **Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease.** Hum Immunol, vol. 70, pp. 1026-34, 2009

LE BOUTEILLER, P.; **HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions.** Crit Rev Immunol, vol. 14, pp. 89, 1994.

LE BOUTEILLER, P.; LENFANT, F.; **Antigen-presenting functions of the non-classical HLA-E,-F and -G class I molecules: the beginning of a story.** Rev Immunol, vol. 147, pp.301, 1996.

LE BOUTEILLER, P.; BLASCHITZ, A.; **The functionality of HLA-G is emerging.** Immunol Rev, vol. 167, pp. 233, 1999.

LE BOUTEILLER, P.; SOLIER, C.; PRÖLL, J.; AGUERRE-GIRR, M.; FOURNEL, S.; LENFANT, F.; **Placental HLA-G expression *in vivo*: where and what?** Hum Reprod Up, vol. 5, pp. 223, 1999.

LE PAGE, M.E.L.; GOODRIDGE, J.P.; JOHN, E.; CHRISTIANSEN, F.T.; WITT, C.S.; **Killer Ig-like Receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN- γ responses to soluble HLA-G preparations.** J Immunol, vol. 192, pp. 732-740, 2014.

LEFEBVRE, S.; MOREAU, P.; GUIARD, V.; IBRAHIM, E.C.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P.; **Molecular mechanisms controlling constitutive and IFN-gamma-inducible HLA-G expression in various cell types.** J Reprod Immunol, vol. 43, pp. 213, 1999.

LEE, N.; MALACKO, A.R.; ISCHITANI, A.; CHEN, M.C.; BAJORATH, J.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E.; **The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association.** Immunity, vol. 3, pp. 591, 1995.

LEVRAN, D.; FARHI, J.; NAHUM, H.; ROYBURT, M.; GLEZERMAN, M.; WEISSMAN, A.; **Prospective evaluation of blastocyst stage transfer vs zygote intrafallopian tube transfer in patients with repeated implantation failure.** Fertil Steril, vol. 77, pp. 971-977, 2002.

LEVENS, E.D.; WHITCOMB, B.W.; PAYSON, M.D.; LARSEN, F.W.; **Ovarian follicular flushing among low-responding patients undergoing assisted reproductive technology.** Fertil Steril, vol. 91, pp. 1381-84, 2009.

LI, Y.; ZHAO, Y.H.; ZHANG, W.Y.; CUI, M.H.; **Correlation between killer cell immunoglobulin-like receptors genes and pre-eclampsia.** Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, vol. 43, pp. 909-912, 2008.

LJUNGGREN, H. G.; KARRE, K. **In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.** Immunology Today, vol.11, pp. 237-244, 1990.

LOMBARDO, F.; GANDINI, L.; LENZI, A.; DONDERO, F.; **Anti-sperm immunity in assisted reproduction.**J Reprod Immunol, vol. 62, pp. 101-109, 2004.

MALE, V.; TRUNDLEY, A.; GARDNER, L.; NORTHFIELD, J.; CHANG, C.; APPS, R.; MOFFETT, A.; **Natural killer cells in human pregnancy.** Natural killer cells protocols, methods in molecular biology, chapter 30, 2010.

MARSH SGE, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, et al. **Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report**, 2002. Hum Immunol 2003;64:648–54

MARTIN, A.M.; FREITAS, E.M.; WITT, C.S.; CHRISTIANSEN, F.T.; **The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster.** Immunogenetics, vol. 51, pp. 268-280, 2000.

MARTIN, A.M.; KULSKI, J.K.; GAUDIERI, S.; WITT, C.S.; FREITAS, E.M.; TROWSDALE, J.; CHRISTIANSEN, F.T.; **Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B.** Gene, vol. 335, pp. 121–131, 2004.

MEDAWAR, P.B.; **Some immunological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates.** Symp Soc Exp Biol, vol. 7, pp. 320-338, 1953.

MEHRA, N.K.; KAUR, G.; **Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region.** Exp Rev Mol Med, vol. 4, pp. 1, 2003.

MIDDLETON, D.; WILLIAMS, F.; HALFPENNY, I.A.; **KIR genes.**Transpl Immunol, vol. 14, pp. 135-142, 2005.

MILKI, A.A.; JUN, S.H.; HINCKLEY, M.D.; BEHR, B.; GIUDICE, L.C.; WESTPHAL, L.M.; **Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer.** Fertil Steril, vol. 79, pp. 503-506, 2003.

MORADI, S.; BERRY, R.; PYMM, P.; HITCHEN, C.; BECKHAM, S.A.; WILCE, M.C.; WALPOLE, N.G.; CLEMENTS, C.S.; REID, H.H.; PERUGINI, M.A.; BROOKS, A.G.;

ROSSJOHN, J.; VIVIAN, J.P.; **The structure of the atypical killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR2DL4.** J Biol Chem, vol. 290, pp. 10460-71, 2015.

MORALES, P.J.; PACE, J.L.; PLATT, J.S.; LANGAT, D.K.; HUNT, J.S.; **Synthesis of beta(2)-microglobulin-free, disulphide-linked HLA-G5 homodimers in human placental villous cytotrophoblast cells.** Immunol, vol. 122, pp. 179-188, 2007.

MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; GUIARD, V.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P.; **IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes.** Int Immunol, vol. 11, pp. 803, 1999.

MORENO, C.; EMERY, P.; WEST, J.E., DURAND, B., REITH, W., MACH, B., AND BOSS, M.; **Purified X2 binding protein (X2BP) cooperatively binds the class II MHC X box region in the presence of purified RFX, the X box factor deficient in the Bare Lymphocyte Syndrome.** J. Immunol., vol. 155, pp. 4313, 1995.

NAVARRO, F.; LLANO, M.; BELLON, T.; COLONNA, M.; GERAGHTY, D.E.; LOPEZ-BOTET, M.; **The ILT-2 (LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 e HLA-E molecules co-expressed on target cells.** Eur J Immunol, vol. 29, pp. 277, 1999.

NAVARRO, J.; GARRIDO, N.; REMOH&IACUTE, J.; PELLICER, A.; **How does endometriosis affect infertility?** Obstet Gynecol Clin North Am, vol. 30, pp. 181-192, 2003.

NELSON, N.; MARKS, M.S.; DRIGGERS, P.H.; OZATO, K.; **Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription.** Mol Cell Biol, vol. 13, pp. 588, 1993.

NIEPIEKTO-MINIESWSKA, W.; ZUK, N.; DUBIS, J.; **Two new cases of KIR3DP1, KIR2DL4-negative genotypes, one of which is also lacking KIR3DL2.** Arch Immunol Ther Exp, vol. 62, pp. 423-9, 2014.

NOCCHI, I.; FUZZI, B.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; CRISCUOLI, L.; DABIZZI, S.; BIAGIOTTI, R.; PELLEGRINI, S.; MENICUCCI, A.; BARICORDI, O.R.; **Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos.** Hum Reprod, vol. 20, pp. 138, 2005.

NOWAK, I.; MAJORCZYK, E.; PLOSKI, R.; SENITZER, D.; SUN, J.Y.; KUSNIERCZYK, P.; **Lack of KIR2DL4 gene in a fertile Caucasian woman.** Tissue Antigens, vol. 78, pp. 115-9, 2011.

OBER, C.; ALDRICH, C.L.; **HLA-G polymorphisms: neutral evolution or novel function?** J Reprod Immunol, vol. 36, pp. 1-21, 1997.

OBER, C.; ALDRICH, C.; ROSINSKY, B.; ROBERTSON, A.; WALTER, M.A.; WILLADSEN, S.; VERP, M.S.; GERAGHTY, D.E.; **HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival.** Placenta, vol. 19, pp. 127, 1998.

OBER, C.; ALDRICH, C.L.; CHERVONEVA, I.; BILLSTRAND, C.; RAHIMOV, F.; GRAY, H.L.; HYSLOP, T.; **Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates.** Am J Hum Genet, vol. 72, pp. 1425, 2003.

OLCESE, L.; CAMBIAGGI, A.; SEMENZATO, G.; BOTTINO, C.; MORETTA, A.; VIVIER, E.; **Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells.** Journal of Immunology, vol. 158, pp. 5083-5086, 1997.

PANDIAN, Z.; BHATTACHARYA, S.; VALE, L.; TEMLETON, A.; **In vitro fertilization for unexplained subfertility.** Cochrane Database Syst Rev, vol. 18, pp. CD003357, 2005.

PAULI, S.A.; BERGA, S.L.; SHANG, W.; SESSION, D.R.; **Current status of the approach to assisted reproduction.** Pediatric Clin N Am, vol. 56, pp. 467-488, 2009.

PERUSSIA, B.; **The cytokine profile of resting and activated NK cells.** Methods, vol. 9, pp. 370-8, 1996.

PONTE, M.; CANTONI, C.; BIASSONI, R.; TRADORI-CAPPAL, A.; BENTIVOGLIO, G.; VITALE, C.; BERTONE, S.; MORETTA, A.; MORETTA, L.; MINGARI, M.C.; **Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor.** Proc Nat Acad Sci USA, vol. 96, pp. 5674-5679, 1999.

PURDY, A.K.; CAMPBELL, K.S.; **Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR).** Cancer Biol Ther, vol. 8, pp. 13-22, 2009.

RAGNI, G.; SOMIGLIANA, E.; VEGETTI, W.; **Timing of intrauterine insemination: where are we?** Fertil Steril, vol. 82, pp. 25-26, 2004.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E.O. **A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells.** The Journal of Experimental Medicine, vol. 189, pp. 1093-1100, 1999.

RAJAGOPALAN, S.; FU, J.; LONG, E.O.; **Cutting edge: induction of INF-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells.** J Immunol, vol.168, pp. 6208-6214, 2001.

RAJALINGAM, R.; DU, Z.; MEENAGH, A.; LUO, L.; KAVITHA, V.J.; PAVITHRA-ARULVANI, R.; VIDHYALAKSHMI, A.; SHARMA, S.K.; BALAZS, I.; REED, E.F.; PITCHAPPAN, R.M.; MIDDLETON, D.; **Distinct diversity of *KIR* genes in three southern Indian populations: comparison with world populations revealed a link between *KIR* gene content and pre-historic human migrations.** Immunogenetics, vol. 60, pp. 207-217, 2008.

RAYES, R.; BAZARBACHI, A.; KHAZEN, G.; SABBAGH, A.; ZAATARI, G.; MAHFOUZ, R.; **Natural killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) genotypes in two Arab populations: will KIR become a genetic landmark between nations?** Molecular Biology Reproduction, vol. 35, pp. 225-229, 2007.

REBMANN, V.; PFEIFFER, K.; PÄBLER, M.; FERRONE, S.; MAIER, S.; WEISS, E.; GROSSE-WILDE, H.; **Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid.** Tissue Antigens, vol. 53, pp. 14, 1999.

REBMANN, V.; VAN DER VEN, K.; PÄBLER, M.; PFEIFFER, K.; KREBS, D.; GROSSE-WILDE, H.; **Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles.** Tissue Antigens, vol. 57, pp. 15, 2001

REBMANN, V.; SWITALA, M.; EUE, I.; SCHWAHN, E.; MERZENICH, M.; GROSSE-WILDE, H.; **Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos.** Hum Immunol, vol. 68, pp.251, 2007.

REBMANN, V.; SWITALA, I.; EUE, I.; GROSSE-WILDE, H.; **Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy out come after ART: a German multi-center study.** Hum Reprod, vol. 25, pp. 1691-98, 2010.

RIENZI, I.; UBALDI, F.; IACOBELLI, M.; ROMANO, S.; MINASI, M.G.; FERRERO, S.; SAPIENZA, F.; BARONI, E.; GRECO, E.; **Significance of morphological attributes of the early embryo.** Reprod Biomed Online, vol. 10, pp. 669-681, 2005.

RIZZO, R.; FUZZI, B.; STIGNANI, M.; CRISCUOLI, L.; MELCHIORRI, L.; DABIZZI, S.; CAMPIONI, D.; LANZA, F.; MARZOLA, A.; BRANCONI, F.; NOCCI, I.; BARICORDI, O.R.; **Soluble HLA-G molecules in follicular fluid: a tool for oocyte selection in IVF?** J Reprod Immunol, vol. 74, pp. 133-142, 2007.

RIZZO, R.; DAL CANTO, M.B.; STIGNANI, M.; FADINI, R.; FUMAGALLI, D.; RENZINI, M.M.; BORGATTI, M.; GAMBARI, R.; BARICORDI, O.R.; **Production of sHLA-G molecules by in vitro matured cumulus-oocyte complex.** Int J Mol Med, vol. 24, pp. 523-530, 2009a.

RIZZO, R.; STIGNANI, M.; MELCHIORRI, L.; BARICORDI, O.R.; **Possible role of human leukocyte antigen-G molecules in human oocyte/embryo secretome.** Hum Immunol, vol. 70, pp. 970-975, 2009b.

ROUSSEAU, P.; LE DISCORDE, M.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; **The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability.** Hum Immunol, vol. 64, pp. 1005, 2003.

ROUSSET, F.; **Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux.** Mol. Ecol. Resources vol. 8, pp. 103-106, 2008.

SABATIER, C.; GIMENEZ, C.; CALIN-LAURENS, V.; RABOURDIN-COMBE, C.; TOURAINE, J-L.; **Type III lymphocyte syndrome: lack of HLA class II gene expression and reduction in HLA class I gene expression.** Curr Res Acad Sci, vol. 319, pp. 789, 1996.

SARAFANA, S.; COELHO, R.; NEVES, A.; TRINDADE, J.C.; **Aspectos da imunologia da gravidez.** Acta Med Port, vol. 20, pp. 355-358, 2007.

SCHMIDT, C.M.; EHLENFELDT, R.G.; ATHANASIOU, M.C.; DUVICK, L.A.; HEINRICHS, H.; DAVID, C.S.; ORR, H.T.; **Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice – evidence for a appositve region located 1kb 5' to the start site of transcription.** J Immunol, vol. 151, pp. 2633, 1993.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; DUPONT, B.; **NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains.** Tissue Antigens, vol. 48, pp. 285-294, 1996.

SHARKEY, A.M.; GARDNER, L.; HIBY, S.; FARREL, L.; APPS, R.; MASTERS, L.; GOODRIDGE, J.; LATHBURY, L.; STEWART, C.A.; VERMA, S.; MOFFETT, A.; **Killer**

Ig-like receptors expression in uterine NK cells is biased toward recognition of HLA-C and alters with gestational age. J Immunol, vol. 181, pp. 39-46, 2008.

SHER, G.; KESKINTEPE, L.; FISCH, J.D.; ACACIO, B.A.; AHLERING, P.; BATZOFIN, J.; GINSBURG, M.; **Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer.** Fert Steril, vol. 83, pp. 1410, 2005.

SHIMIZU, Y.; DEMARS, R.; **Demonstration by class I gene transfer that reduced susceptibility of human cells to natural killer cell-mediated lyses is inversely correlated with HLA class I antigen expression.** Eur J of Immunol, vol.19, pp. 447-451, 1989.

SILVA, J.S.; **Região reguladora, promotora e exon 4 de HLA-G em casais com histórico de abortamento recorrente.** *Dissertação* apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 2009.

SIPAK-SZMIGIEL, O.; RONIN-WALKNOWSKA, E.; CYBULSKI, C.; PLONKA, T.; LUBINSKI, J.; **Antigens HLA-G, sHLA-G and sHLA-class I in reproductive failure.** Folia Histochem Cytobiol, vol. 45, pp. 137, 2007.

SIPAK-SZMIGIEL, O.; CYBULSKI, C.; WOKOTORCZYK, D.; LUBINSKI, J.; KURZAWA, R.; BACZKOWSKI, T.; RADWAN, M.; RADWAN, P.; RONIN-WALKNOWSKA, E.; **HLA-G polymorphism and *in vitro* fertilization failure in a Polish population.** Tissue Antigens, vol. 79, pp. 348, 2009.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G.; **Birth after the reimplantation of a human embryo.** Lancet, vol. 2, pp. 366, 1978.

SUTO, Y.; MAENAKA, K.; YABE, T.; HIRAI, M.; TOKUNAGA, K.; TADOK, K.; JUJI, T.; **Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization.** Genomics, vol. 35, pp. 270-272, 1996.

TAJIK, N.; SHAHSAVAR, F.; MOUSAVI, T.; RADJABZADEH, M.F.; **Distribution of KIR genes in the Iranian population.** Tissue Antigens, vol. 74, pp. 22-31, 2009.

TAN, Z.; RANDALL, G.; FAN, J.; CAMORETTI-MERCADO, B.; BROCKMAN-SCHNEIDER, R.; PAN, L.; SOLWAY, J.; GERN, J.E.; LEMANSKE, R.F.; NICOLAE, D.; OBER, C.; **Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma.** Am J Hum Genet, vol. 81, pp. 829, 2007.

TAN, C.Y.; HO, J.F.V.; CHONG, Y.S.; LOGANATH, A.; CHAN, Y.H.; RAVICHANDRAN, J.; LEE, C.G.; CHONG, S.S.; **Paternal contribution of HLA-G*0106 significantly increases risk for pre-eclampsia in multigravid pregnancies.** Mol Hum Reprod, vol. 14, pp. 317, 2008.

TAN, C.Y.; CHONG, Y.S.; LOGANATH, A.; CHAN, Y.H.; RAVICHANDRAN, J.; LEE, C.G.; CHONG, S.S.; **Possible gene-gene interaction of KIR2DL4 with its cognate ligand HLA-G in modulating risk for preeclampsia.** Reprod Sci, vol. 16, pp. 1135-1143, 2009.

THANOS, D.; MANIATIX, T.; **NF- κ B: a lesson in family values.** Cell, vol. 80, pp. 529, 1995.

THESSALONIKI ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. **Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome.** Fertil Steril, vol. 89, pp. 505-522, 2008.

TRIPATHI, P.; ABBAS, A.; NAIK, S.; AGRAWAL, S.; **Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy.** Tissue Antigens, vol. 64, pp. 706, 2004.

TROWSDALE, J.; **Genetics and polymorphism: class II antigens.** Br Med Bull, vol.43, pp.15, 1987.

TROWSDALE, J.; BARTEN, R.; HAUDE, A.; STEWART, C.A.; BECK, S.; WILSON, M.J.; **The genomic context of natural killer receptor extended gene families.** Immunol Rev, vol. 181, pp. 20-38, 2001.

UHRBERG, M.; VALIANTE, N.M.; SHUM, B.P.; SHILLING, H.G.; LIENERT-WEIDENBACH, K.; CORLISS, B.; TYAN, D.; LANIER, L.L.; PARHAM, P. **Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes.** Immunity, vol.7, pp. 753-763. 1997.

VAN DEN ELSEN, P.J.; PEIJNENBURG, A.; VAN EGGERMOND, M.C.J.A.; GOBIN, S.J.P.; **Shared regulatory elements in the promoters of MHC class I and class II genes.** Immunology Today, vol. 19, n. 7, pp. 308, 1998a.

VAN DEN ELSEN, P.J.; GOBIN, S.J.P.; VAN EGGERMOND, M.C.J.A.; PEIJNENBURG, A.; **Regulation of MHC class I and class II genes transcription: differences and similarities.** Immunogenetics, vol. 48, pp 208, 1998b.

VAN DER VEN, K.; OBER, C.; **HLA-G polymorphisms in African Americans.** J Immunol, vol. 153, pp. 5628, 1994.

VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S; **HLA-G polymorphisms and molecule function – questions and more questions – a review.** Placenta, vol. 21, pp. 86, 2000.

VAN LIEROP, M.J.; WINANDS, F.; LEKE, Y.W.; EMMER, P.M.; LUKASSEN, H.G.; VAN DER BRAAT, D.D.M.A.; MOSSELMAN, S.; JOOSTEN, J.; **Detection of HLA-G by a specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B.** Mol Hum Reprod, vol. 8, pp. 776, 2002.

VARGAS, R.G. Repertório dos genes *KIR* e polimorfismos dos genes *HLA-Cw*, *KIR2dl4* e *HLA-G* no abortamento recorrente. *Tese* apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 2009.

VARGAS RG, SARTURI PR, MATTAR SB, BOMPEIXE EP, SILVA JD, PIRRI A, BICALHO, M.G.; **Association of HLA-G alleles and 3' UTR 14-bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples.** Hum Immunol, vol. 72, pp. 479-85, 2011.

VEECK, L.L.; **An atlas of human gametes and conceptuses: an illustrated reference for assisted reproductive technology.** New York: Parthenon Pub. Group 1999.

VELA, G.; LUNA, M.; SNADLER, B.; COPPERMAN, A.B.; **Advances and controversies in assisted reproductive technology.** Mount Sinai J Med, vol. 76, pp. 506-520, 2009.

VELICKOVIC, M.; VELICKOVIC, Z.; DUNCKLEY, H.; **Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Pacific Islands populations.** Immunogenetics, vol. 58, pp. 523-532, 2006.

VELICKOVIC, M.; VELICKOVIC, Z.; PANIGORO, R.; DUNCKLEY, H.; **Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Indonesian populations of Java, Kalimantan, Timor and Irian Jaya.** Tissue Antigens, vol. 73, pp. 9-16, 2008.

VERCAMMEN, M.J.; VERLOES, A.; VAN DE VELDE, H.; HAENTJENS, P.; **Accuracy of soluble human leukocyte antigen-G for predicting pregnancy among women undergoing infertility: meta-analysis.** Hum Reprod Up, vol. 14, pp. 209, 2008.

VERKAUF, B.S.; **The incidence, symptoms and signs of endometriosis in fertile and infertile women.** J Fla Med Assoc, vol. 74, pp. 671-675, 1987.

VERMA, S.; LING, A.; LOKE, Y.W.; **Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells.** Eur J Immunol, col. 27, pp. 979-83, 1997.

VIANNA, P.; DALMÁZ, C.A.; VEIT, T.D.; TEDOLDI, C.; ROISENBERG, I.; CHIES, J.A.B.; **Immunogenetics of pregnancy: Role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women.** Hum. Immunol, vol. 68, pp. 668, 2007.

VILCHES, C.; RAJALINGAM, R.; UHRBERG, M.; GARDINER, C.M.; YOUNG, N.T.; PARHAM, P.; **KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains.** Journal Immunological, vol. 164, pp. 5797-5804, 2000.

VILCHES, C.; PARHAM, P.; **KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity.** Annual Reviews Immunological, vol. 20, pp. 217-251, 2002.

VIVIER, E.; RAULET, D.H.; MORETTA, A.; CALIGIURI, M.A.; ZITVOGEL, L.; LANIER, L.L.; YOKOYAMA, W.M.; UGOLINI, S.; **Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells.** Science, vol. 331, pp. 44-49, 2011

WARNER, C.M.; LAMPTON, P.W.; NEWMARK, J.A.; COHEN, J.; **Soluble human leukocyte antigen-G and pregnancy success.** Reprod Biomed Online, vol. 17, pp. 470-501, 2008.

WILLIAMS, F.; MEENAGH, A.; SLEATOR, C.; MIDDLETON, D.; **Investigation of killer cell immunoglobulin like receptor gene diversity: I. KIR2DL4.** Hum Immunol, vol. 65, pp. 31-38, 2004.

WILSON, M.J.; TORKAR, M.; TROWSDALE, J. **Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene.** Tissue Antigens, vol. 49, pp. 574-579, 1997.

WILSON, M.J.; TORKAR, M.; HAUDE, A.; MILNE, S.; JONES, T.; SHEER, D.; BECK, S.; TROWSDALE, J.; **Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families.** Proc Natl Acad Sci USA, vol. 97, pp. 4778-89, 2000.

WITT, C.S.; GOODRIDGE, J.; GERBASE-DELIMA, M.G.; DAHER, S.; CHISTIENSEN, F.T.; **Maternal KIR repertoire is not associated with recurrent spontaneous abortion.** Hum Reprod, vol. 19, pp. 2653-2657, 2004.

XUE, S.; YANG, J.; YAO, F.; XU, L.; FAN, L.; **Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/114 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population.** Tissue Antigens, vol. 69, pp. 153, 2007.

YAMAMOTO, A.; MIZUKAMI, Y.; SAKURAI, H.; **Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*.** J Biol Chem, vol. 280, pp. 11911-19, 2005.

YAN, W.H.; LIN, A.; CHEN, X.J.; DAI, M.Z.; GAN, L.H.; ZHOU, M.Y.; ZHU, M.; SHI, W.W.; LIU, J.M.; **Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions.** Tissue Antigens, vol. 68, pp. 521, 2006a.

YAN, W.H.; FAN, L.A.; YANG, J.Q.; XU, L.D.; GE, Y.; YAO, F.J.; **HLA-G polymorphism in a Chinese Han population with recurrent spontaneous abortion.** Int J Immunogenet, vol. 33, pp. 55, 2006b.

YAN, W.H.; LIN, A.; CHEN, B.G.; ZHOU, M.Y.; DAI, M.Z.; CHEN, X.J.; GAN, L.H.; ZHU, M.; SHI, W.W.; LI, B.L.; **Possible roles of KIR2DL4 expression on uNK cells in human pregnancy.** Am J Reprod Immunol, vol. 57, pp. 233-242, 2007.

YAO, Y.Q.; BARLOW, D.H.; SARGENT, I.L.; **Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses.** J Immunol, vol. 175, pp. 8379, 2005.

YIE, S.M.; LI, L.H.; XIAO, R.; LIBRACH, C.L.; **A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia.** Mol Hum Reprod, vol. 14, pp. 649, 2008.

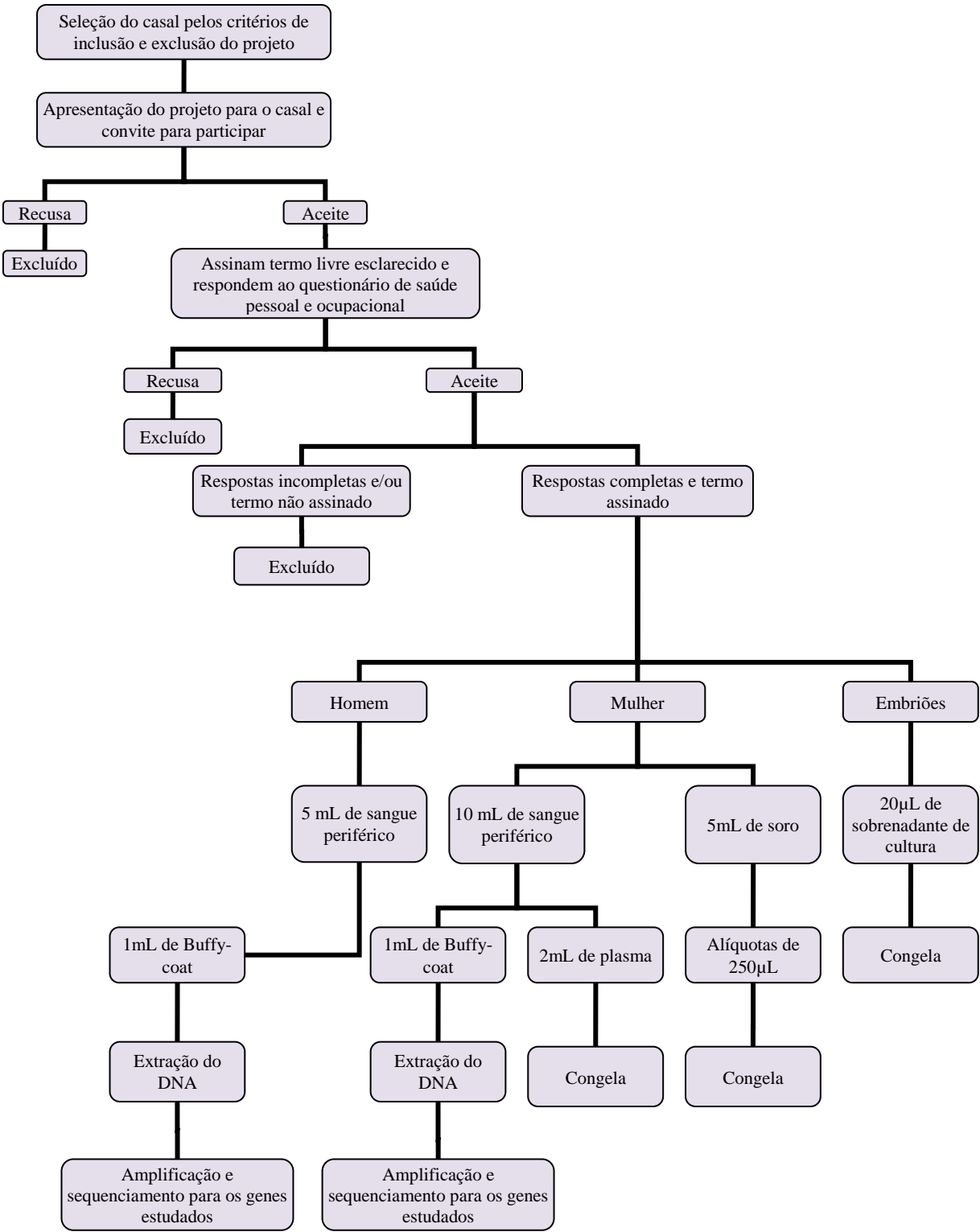
ZHU, F.M.; JIANG, K.; LV, Q.F.; HE, J.; YAN, L.X.; **Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor KIR2DL4 diversity by sequence-based typing in Chinese population.** Tissue Antigens, vol. 67, pp. 214-221, 2006.

APÊNDICE

APÊNDICE I

MATERIAL E MÉTODOS

DELINEAMENTO



Estudo clínico primário, observacional, com caráter transversal e comparativo.

AMOSTRA

Participaram do estudo 45 casais euro-brasileiros submetidos a TRA devido a impedimento de concepção natural. Foram excluídos casais com relato de endometriose, idade materna superior a 35 anos, volume ovariano menor que 3cm³, azoospermia obstrutiva, mulheres que não responderem de forma esperada ao tratamento com estimulação de menos que 12 folículos antrais ou 3 óvulos, e níveis hormonais de FSH e Estradiol superior a 10 e a 80, respectivamente e, considerados níveis mínimos, pela Associação Norte-Americana de Reprodução para assegurar que o insucesso reprodutivo não seja devido a baixa resposta ao tratamento.

Os casais foram recrutados pela clínica “Conceber - Centro de Medicina Reprodutiva”, Curitiba, no estado do Paraná, sul do Brasil, entre outubro de 2009 a outubro de 2014. Sendo coletado de cada casal 5mL do sangue periférico do homem (sangue total), 10mL do sangue materno (5mL de sangue total e 5mL de soro).

O grupo controle foi composto por 131 casais voluntários, sem parentesco, que apresentaram duas ou mais gestações a termo, sem registro de abortamento de causa desconhecida ou submissão a técnicas artificiais para reprodução e 35 mulheres gestantes, sem coleta do marido. As amostras de sangue periférico foram coletadas e estocadas no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade - LIGH desde 2009, 5mL de sangue periférico do homem (5mL de sangue total) e 10mL de sangue periférico da mulher (5mL de sangue total e 5mL de soro) pela aluna Fabíola Nardi. Sendo pareados com o grupo paciente de acordo com etnia e classe sócio-econômica.

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) (Anexo I). Os voluntários de ambos os grupos assinaram termo consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário contendo dados referentes a saúde pessoal e ocupacional (Anexo II).

PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

O processamento e análise das amostras foram realizados no LIGH, Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná – BR.

Extração

A extração do DNA genômico nas amostras de ambos os grupos foi realizada pela técnica de *salting out*, descrita por Lahiri e Nurnberger (1991). Posteriormente, realizou-se leitura de densidade óptica e análise da pureza, do DNA para diluição das amostras para uma concentração de uso de 50 ng/μl de DNA. As amostras de DNA foram armazenadas em temperatura de -20°C.

Genotipagem

Após confirmação da concentração e pureza PCRs foram realizadas para cada amostra de DNA, contendo um volume final de 25 μL, composto por tampão *Taq* 10X, 0,45 pmol de cada dNTP (*Invitrogen*), 2 mM de MgCl₂, 2U *Taq* (*Invitrogen*), 10 pmol ou 20 pmol de cada primer específico para cada um dos fragmentos e 50 ng de DNA.

Devida a extensão da região 5' UTR (1500pb) optou-se por realizar a amplificação em três fragmentos, através do uso de 3 pares de *primers* (*Foward 1*: ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATG, *Reverse 1*: GTGTGCC TTTGAATCCCGATGC, *Foward 2*: CTGTGAGGTGAATAAAGTTTGTGC e *Reverse 2*: TGTGACTCTGTCTTGCAACCG, (descrito por SILVA, 2009) *Foward 3*: TCTTCTAGAAGAGTA e *Reverse 3*: GTTTCCTCCTGACCCCGCACT) com temperatura

de anelamento de 66°C e tamanho dos fragmentos 638pb, 637pb e 562pb, respectivamente. A região codificadora do gene *HLA-G* com os exons 2, 3 e 4 amplificados por 3 pares de *primers* distintos (*Forward*: GGGTCGGGCGGGTCTCAA e *Reverse*: TCCGTGGGGCATGGAGGT, para o exon 2, *Forward*: CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG e *Reverse*: CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA, para o exon 3, *Forward*: CCATGAGAGATGCAAAGTGCT e *Reverse*: TGCTTTCCCTAACAGACATGAT, para o exon 4), com temperaturas de anelamento de 66°, 68° e 66°, e tamanho dos fragmentos 588pb, 456pb e 364pb, respectivamente, conforme descrito por CASTELLI *et al.*, 2007.

O gene *KIR2DL4* foi amplificado em dois fragmentos (exon 4 e 5 e exon 7 ao 9) utilizando 2 pares de *primers* (*Forward*: TGGTCAGGACAAGCCCTTCTGC e *Reverse*: TCCTCACCTGTGACAGAAACAG, para o exon 4 ao 5, *Forward*: CCTGCATGCTGTGATTAGGTA e *Reverse*: TCAGATTCCAGCTGCTGGTAC, para o exon 7 ao 9), com temperatura de anelamento de 63°C, e tamanho dos fragmentos 1458pb e 974pb, respectivamente, conforme descrito por (ZHU *et al.*, 2006).

A PCR atendeu às mesmas as condições de uma denaturação inicial a 96°C por 5', 35 ciclos de 96°C por 1', temperatura de anelamento do par de *primer* específico por 30'' e 72°C por 30'' e um anelamento final de 72°C por 5'. A confirmação da amplificação se deu pela visualização em gel de agarose 1% (Figura 1). Após essa etapa, ocorreu a purificação dos produtos amplificados utilizando-se as enzimas Exonuclease I (EXO I) (10U) e SAP (1U) (USB Corporation, Staufem, Alemanha) e produto de PCR (concentração aproximada de 100 ng), volume final de 10 µL, 37°C por 60' e 80°C por 15'.

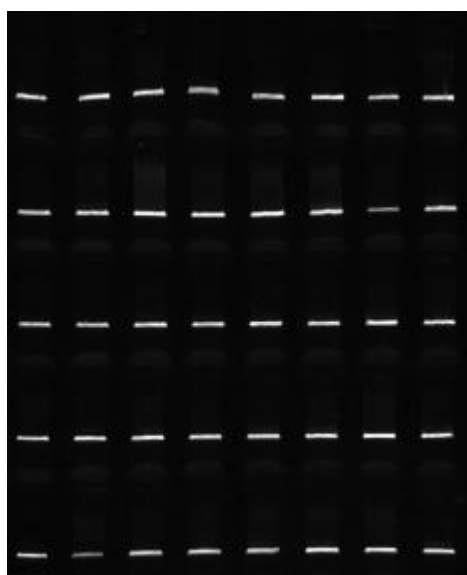


Figura1: Gel de agarose 1% para checagem da PCR.

Na reação de sequenciamento do gene *HLA-G* foram utilizados os mesmos *primers* da reação de amplificação. No entanto, uma vez que o produto de amplificação para os exons do gene *KIR2DL4* foram amplos, inclusive contendo introns, no sequenciamento ocorre o uso de pares de *primers* internos (*Forward*: TGGTCAGGACAAGCCCTTCTGC e *Reverse*: CTGTGACCATGATCACCAGGG, para o exon 4; *Forward*: TATATGAGAAACCTTCGCTTA e *Reverse*: TCCTCACCTGTGACAGAAACAG, para o exon 5, *Forward*: CCTGCATGCTGTGATTAGGTA e *Reverse*: TCTGTGAGCTGAAGGCAGGGG, para o exon 7 e *Forward*: TCAGGATTTCCCTCTCTCCAG e *Reverse*: TCAGATTCCAGCTGCTGGTAC, para o exon 9). A reação utiliza o kit *Big Dye v.3.1* da *ABI PRISM®* (Applied Biosystems, CA, USA), sendo as condições de 35 ciclos de 96°C por 15'', 54°C por 15'' e 60° por 4' e um anelamento final de 72°C por 5'.

O produto de amplificação é purificado com etanol e a análise ocorre no sequenciador *ABI3130* ou *ABI3500* (Applied Biosystems, CA, USA) e então, analisa-se o eletroferograma pelo programa *SeqAnalyses* (Applied Biosystems, CA, USA) (Figura 2).

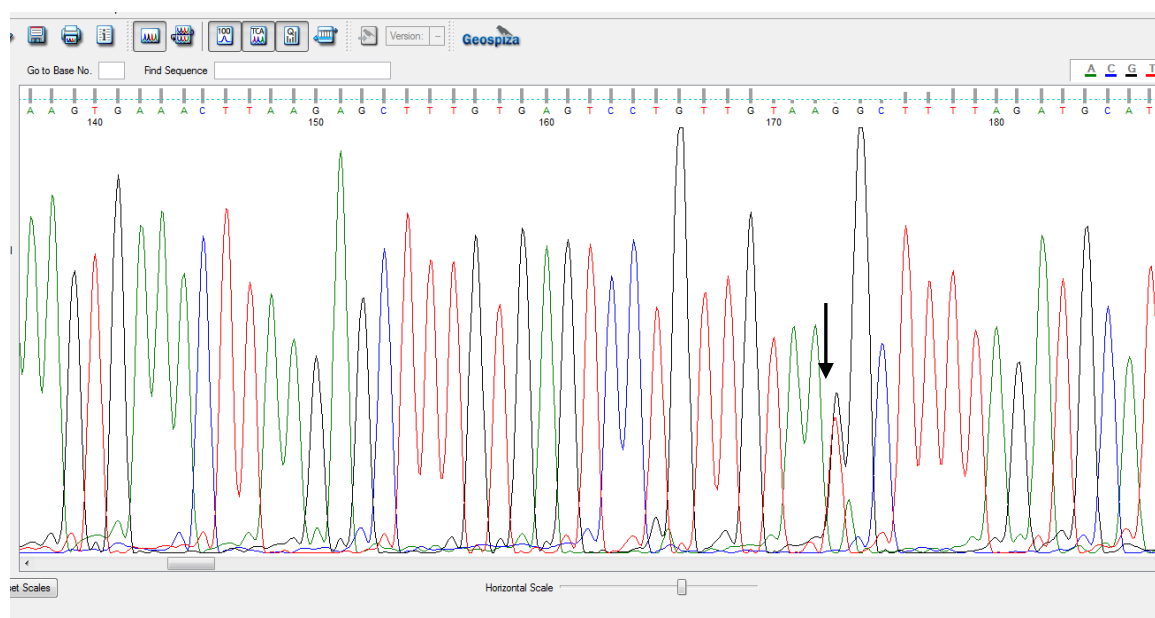


Figura 2: Parte de um eletroferograma, mostrando um indivíduo heterozigoto.

Análise estatística

As análises foram realizadas por meio de comparações entre a sequência FASTA contido no programa SeqScape versão 2.5, disponível na página <<http://www.ensembl.org/index.html>> e a sequência obtida pelo programa SeqAnalyses.

As frequências genótípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta. A comparação entre amostras (pacientes *vs* controles; sucesso *vs* insucesso na TRA) foram realizadas através de tabelas de contingência 3x2 (Teste G) e 2x2 (Teste Exato de Fisher) usando os programas GENEPOP 4.0.10 e BIOESTAT 5.0, respectivamente, sendo representativo de significância $p \leq 0,05$, sendo previsto o cálculo de OR (ODD RATIO) para as comparações estatisticamente significativas, através do BIOESTAT 5.0, com IC 95%.

A estimativa dos haplótipos e suas frequências foram obtidas com o uso do programa ARLEQUIN Versão 3.11 Software, através do algoritmo de maximização da expectativa (EM), com 1000 repetições (*bootstrap*). O mesmo programa foi utilizado para estimativa dos valores de desequilíbrio de ligação e a confirmação do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

ANEXO

ANEXO I



HOSPITAL DE CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Curitiba, 02 de agosto de 2.001.

Ilmo (a) (s) Sr. (a)(s)

MARIA DA GRAÇA BICALHO DE LACERDA

Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de pesquisa **"DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELEVANTES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALO-ENXERTO"**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP-HC nº 037ext.019/2001-07

O referido projeto foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 31 de julho de 2.001.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente

Prof. Dr. Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Serres Humanos do Hospital de Clinicas – UFPR

ANEXO II

Laboratório de Imunogenética Humana (LIGH)**Departamento de Genética – UFPR**

PROJETO: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CASAL PACIENTE**CASAL FER –****1 – Identificação do Casal**

1 - Nome da mulher

2 - Data de Nas.

Idade

G. Étnico

3 – Profissão

G. Sanguíneo

4 – Fumante () Sim

Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)

() Não

5 – Nome do Marido

6 – Data de Nas.

Idade

G. Étnico

7 – Profissão

G. Sanguíneo

8 – Fumante () Sim

Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)

() Não

9 – Endereço:

Nº

Apartamento

Bairro

Cidade

Estado

CEP

Tel. Res.

Tel. Com.

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união _____

Idade da mulher ao se casar _____

2 – Consanguinidade: () S () N

Grau de parentesco: _____

3 – Relato de casos de infertilidade ou dificuldade de engravidar na família

() Sim () Não

Se sim: () família da mulher

() família do homem

4 – Nº total de tratamentos de reprodução anteriores: _____ Abortos _____

6 – Causa da infertilidade _____

7 – Medicação para indução da ovulação _____

8 – Número de óvulos obtidos _____

9 – Número de embriões transferidos _____

Qualidade do embrião _____

10 – Número de embriões vivos _____

11 – Avaliação no 3º dia após a estimulação

Volume ovariano _____

Nº de folículo antral _____

Nível de FSH (Folículo estimulante) _____

Nível de Estradiol _____

3 – Antecedentes Maternos

1 – Concebe facilmente ()Sim () Não

2 – Usa método anticoncepcional? ()Sim () Não

Há quanto tempo? _____

Qual? _____

3 – Idade da primeira menstruação

4 – Enfermidade aguda? ()Sim () Não

Especifique: _____

5 – Enfermidade crônica? ()Sim () Não

Qual? _____

6 – Doença auto-imune? ()Sim () Não

Qual? _____

7 – Recebeu transfusão sanguínea? ()Sim () Não

Quando? _____

5 – Outros fatores

1 – Fatores femininos

a) Problemas ovulatórios com Clamídias ()Sim () Não

b) Cervix incompetente ()Sim () Não

c) Síndrome de Asherman ()Sim () Não

d) Efeito da fase luteal ()Sim () Não

e) Problemas anatômicos ()Sim () Não

Quais? _____

2 – Fatores masculinos

a) Prostatite ()Sim () Não

3 – Fatores do Casal

a) Infecção por Micoplasma ()Sim () Não

Laboratório de Imunogenética. Departamento de Genética – UFPR**CONTROLES: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade****CASAL CONTROLE****CASAL FER –****1 – Identificação do Casal**

1 - Nome da mulher

2 - Data de Nas.

Idade

G. Étnico

3 – Profissão

G. Sanguíneo

4 – Nome do Marido

5 – Data de Nas.

Idade

G. Étnico

6 – Profissão

G. Sanguíneo

7 – Endereço:

Nº

Apartamento

Bairro

Cidade

Estado

CEP

Tel. Res.

Tel. Com.

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união

Consanguinidade: ()S ()N

2 – Idade da mulher ao se casar

Grau de parentesco:

3 – Nº total de concepções:

Abortos:

Natimortos:

N. vivos:

4 – Concepções: 1ª 2ª

3ª

4ª

5ª

6ª

5 – Outras uniões ou casamentos:

Consanguinidade: ()S ()N

6 – Data da união:

Nº de concepções:

7 – Idade da mulher ao se casar

8 – Outras uniões ou casamentos:

Consanguinidade: ()S ()N

9 – Data da união:

Nº de concepções:

10 – Idade da mulher ao se casar

3 – Antecedentes Maternos

1 – Concebe facilmente

2 – Usa método anticoncepcional?

Há quanto tempo? Qual?

3 – Idade da primeira menstruação

4 – Enfermidade aguda?

Especifique:

5 – Enfermidade crônica?

6 – Doença auto-imune?

7 – Recebeu transfusão sanguínea?

Quando?

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você está sendo convidado a participar como: () PACIENTE () CONTROLE de um estudo intitulado “DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALOENXERTO E ENXERTO SEMI-ALOGÊNICO”. É através das pesquisas, inclusive básicas, que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância;
- b) O objetivo desta pesquisa é tentar contribuir para que órgãos transplantados como o rim sejam melhor aceitos pelo receptor, bem como contribuir para tentar esclarecer fenômenos relacionados aos abortos recorrentes de causas desconhecidas e ao sucesso implantacional. E a participação de controles neste caso é de fundamental importância, pois através das comparações entre transplantes bem aceitos ou não é que poderemos chegar a fatos importantes, assim como entre aqueles casais com abortos de repetição e aqueles casais com dois ou mais filhos;
- c) Caso você participe da pesquisa, será necessário que você forneça uma amostra de sangue (10ml);
- d) O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam danos a pacientes ou controles;
- e) Não há riscos para você;
- f) Para tanto você deverá comparecer ao LIGH, para coleta de sangue;
- g) A pesquisadora responsável pelo projeto, Profa. Maria da Graça Bicalho – fone: 361-1729 poderá ser contatada no LIGH;
- h) Está garantido que você terá todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa;
- i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa;
- j) As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório, publicação ou por qualquer meio, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida;
- l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são de responsabilidade dos pacientes ou controles;
- m) Pela sua participação na pesquisa você não receberá qualquer valor em dinheiro;
- n) Quando os resultados forem divulgados, não aparecerá seu nome e sim um código;

Eu, li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa para a qual fui convocado a participar. A explicação que recebi menciona o fato relacionado a coleta de sangue e seus inconvenientes. Eu entendi que sou livre para interromper ou não participar da pesquisa.

Eu concordo, voluntariamente, em participar desta pesquisa.

Ass. Paciente/Controle _____

Ass. Pesquisador _____

Data ____/____/____